

Einfluss der Neutralen Endopeptidase auf Alzheimersche Erkrankung, Alkoholkonsum und Adipositas

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Pharmazie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

von
Matthias Becker
geboren am 07.06.1974
in Ludwigslust

Präsident der Humboldt-Universität
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. F. Melzig
2. Prof. Dr. T. Walther

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2006

(Abstract deutsch)

Als Metallopeptidase mit einem großen Substratspektrum hat die Neutrale Endopeptidase (Neprilysin, EC 3.4.24.11, NEP) Einfluss auf so verschiedene Krankheiten oder pathophysiologischen Vorgänge wie Hypertonie, die Alzheimersche Erkrankung oder krankhafte Prostataveränderungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Beziehungen der NEP zur Alzheimerschen Erkrankung sowie zu zwei weiteren pathophysiologischen Veränderungen – einem erhöhten Alkoholkonsum unter Stress sowie zu Adipositas/Übergewicht – eingehend untersucht. In Bezug auf die Alzheimersche Erkrankung wurde der Frage nachgegangen, warum Mäuse und Ratten keine vollständige Alzheimer-Symptomatik ausbilden. Dabei wurde ein verlangsamter Abbau des murinen beta-Amyloid-Peptids im Gegensatz zur humanen Form gefunden und biochemisch charakterisiert. Diese Befunde wurden durch den Nachweis, dass das murine im Gegensatz zum humanen Abeta-Peptid keine Amyloidfibrillen ausbildet, komplettiert. Am Modell der NEP-Knockout-Maus wurde in freiwilligen Trinkversuchen ein Alkoholverbrauch beobachtet, der dem von C57BL6-Wildtyp-Mäusen vergleichbar war. Nach einem kurzzeitigen sozialen Stress nahm jedoch der Alkoholkonsum der NEP-Knockout-Mäuse für ca. 3 Wochen deutlich und nach einem weiteren Stress sogar für mehrere Monate zu. An NEP-Knockout-Mäusen wurde überdies erstmals ein übergewichtiger Phänotyp beschrieben, der der menschlichen polygenetischen Adipositas sehr ähnlich ist. Dieser Phänotyp wurde eingehend physiologisch und biochemisch sowie in Abhängigkeit von verschiedenen Futtersorten (fettreiche bzw. Kohlenhydrat-modifizierte Nahrung) charakterisiert. In diesem Rahmen wurde erstmals die Hydrolyse des orexigenen Peptids Galanin durch die NEP beschrieben. Erste Erklärungsansätze für die Ausprägung des übergewichtigen Phänotyps bei NEP-Knockout-Mäusen sowie die Eignung dieses Tiermodells als Modell der komplexen humanen Adipositas werden diskutiert.

Neprilysin

Alzheimersche Erkrankung

Alkoholkrankheit

Adipositas

(Abstract english)

As a metallopeptidase with a large substrate spectrum neutral endopeptidase (Neprilysin, EC 3.4.24.11, NEP) influences diseases or pathophysiological states as different as hypertonia, Alzheimer's disease or pathologic changes of the prostate. In this work the relations of NEP to Alzheimer's disease and to two other pathophysiologic changes – an increased alcohol consumption under stress conditions as well as to adiposity/obesity – were examined in detail. Regarding Alzheimer's disease the question was addressed why mice and rats do not show a complete Alzheimer's pathology. The hydrolytic rate of the murine beta-Amyloid peptide was found to be decreased in contrast to the human form. The hydrolysis was further characterized by biochemistry. These findings were completed by the confirmation that murine abeta peptide does not form amyloid fibrils in contrast to the human peptide. By using the NEP knockout-mouse model in a free-choice drinking paradigm these mice showed an alcohol consumption comparable to that of C57BL6 wildtype mice. However, after a temporary social stress the alcohol consumption of the NEP knockout-mice increased for approx. 3 weeks and after a further stress it remained on a higher level for several months. Moreover, an obese phenotype of NEP knockout-mice was described here for the first time. This phenotype was found to be very similar to the human polygenetic adiposity. It was physiologically and biochemically characterized in detail as well as its dependence on different food types (high-fat and carbohydrate-modified diet). Within this work the hydrolysis of the orexigenic peptide galanin by NEP was described for the first time. A first explanatory approach to the development of the obese phenotype in NEP knockout-mice as well as the suitability of this animal model as a model of the complex human obesity is discussed.

neprilysin

Alzheimer's disease

alcohol disease

obesity

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG.....	7
I - 1. ÜBERBLICK ÜBER DIE NEP	10
I - 1.1. Geschichte	10
I - 1.2. Struktur und Moleküleigenschaften.....	11
I - 1.3. Aktivität und Spezifität.....	13
I - 1.4. Vorkommen und biologische Funktionen	16
I - 2. ZIELSTELLUNG UND PROBLEMDARSTELLUNG	19
II. NEP UND ALZHEIMERSCHE ERKRANKUNG	22
II - 1. EINLEITUNG	22
II - 1.1. Prävalenz und Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung	22
II - 1.2. Entstehung und Biochemie des A β -Peptids	24
II - 1.3. Abbau des A β -Peptids	28
II - 1.4. Problemstellung der Arbeit.....	31
II - 2. METHODEN	33
II - 2.1. Peptide	33
II - 2.2. Amyloid-Inkubation	34
II - 2.3. HPLC-Analytik.....	36
II - 2.4. Massenspektrometrie (MS).....	37
II - 2.5. Elektronenmikroskopie.....	38
II - 2.6. Statistik	38
II - 3. ERGEBNISSE	38
II - 3.1. Abbauversuche	38
II - 3.2. Massenspektrometrie (MS).....	40
II - 3.3. Elektronenmikroskopie.....	43
II - 4. DISKUSSION	45
II - 4.1. Erklärungsansätze für die fehlende Alzheimer-Symptomatik bei Mäusen und Ratten.....	46
II - 4.2. Hydrolytische Angriffsstellen der NEP innerhalb von A β	52
III. NEP UND ALKOHOLKONSUM.....	55
III - 1. EINLEITUNG	55
III - 1.1. Aufgabenstellung.....	58
III - 2. METHODEN	59
III - 2.1. Tierhaltung.....	59
III - 2.2. Trinkversuche	60
III - 2.3. Enzym- und Blut-Analytik	61
III - 2.4. Enkephalinabbau	63
III - 2.5. Alkoholabbau-Kinetik nach intraperitonealer Verabreichung.....	63
III - 2.6. Statistik	63
III - 3. ERGEBNISSE	64

III - 3.1.	Präferenztests.....	64
III - 3.2.	Ermittlung einer geeigneten Alkoholkonzentration und der Gesamttrinkmenge.....	66
III - 3.3.	Alkoholabbau-Kinetik nach intraperitonealer Verabreichung.....	67
III - 3.4.	Enkephalinabbau und Einfluss der Opioidrezeptoren	67
III - 3.5.	Trinkverhalten unter NEP-Inhibierung durch Candoxatril.....	69
III - 3.6.	Trinkverhalten unter Stress.....	70
III - 4.	DISKUSSION	76
III - 4.1.	Die Rolle von CRH und anderen peptidischen Mediatoren	77
III - 4.2.	Wechselseitige Beziehungen zwischen NEP, Alkoholaufnahme und Stressgeschehen	80
III - 4.3.	Einfluss von NEP-Inhibitoren auf den Alkoholkonsum.....	83
IV.	NEP UND ÜBERGEWICHT	85
IV - 1.	EINLEITUNG.....	85
IV - 1.1.	Mögliche Ursachen für Übergewicht	86
IV - 1.2.	Molekulare Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme.....	87
IV - 1.3.	Bedeutung der NEP für peptidische Mediatoren.....	90
IV - 1.4.	Aufgabenstellung.....	94
IV - 2.	METHODEN.....	94
IV - 2.1.	Allgemeine Bemerkung.....	94
IV - 2.2.	Beschreibung der Tiergruppen	94
IV - 2.3.	Versuchstiere und deren Haltung	95
IV - 2.4.	Futtersorten.....	96
IV - 2.5.	Bestimmung des Anteils von Körperfett, Muskelmasse und Extrazellulärflüssigkeit am Gesamtkörpergewicht.....	97
IV - 2.6.	Organgewichte, Blutparameter und Enzymaktivitäten.....	98
IV - 2.7.	Leptin-Spiegel	99
IV - 2.8.	Oraler Glucosetoleranz-Test (OGT).....	99
IV - 2.9.	Futtermittelverbrauch.....	99
IV - 2.10.	Energiehaushalt	100
IV - 2.11.	Peptidabbau durch die NEP	100
IV - 2.12.	Statistik allgemein	100
IV - 3.	ERGEBNISSE.....	101
IV - 3.1.	Beschreibung des Phänotyps	101
IV - 3.2.	Vergleich von pelletiertem und extrudiertem Futter (Gruppe 2).....	104
IV - 3.3.	Behandlung mit fettreicher und fettarmer Diät (Gruppe 4).....	109
IV - 3.4.	Oraler Glucosetoleranz-Test (OGT).....	113
IV - 3.5.	Futtermittelverbrauch (Gruppe 2)	114
IV - 3.6.	Energiehaushalt	115
IV - 3.7.	Zusammenhang von NEP-Aktivität und Körpergewicht.....	116
IV - 3.8.	Peptidabbau durch die NEP	118
IV - 4.	DISKUSSION	122
IV - 4.1.	Allgemeiner Phänotyp	122

IV - 4.2. Einfluss verschiedener Futtersorten.....	123
IV - 4.3. Anteil von Körperfett, Muskelmasse und Extrazellulärflüssigkeit am Gesamtkörpergewicht.....	125
IV - 4.4. Biochemische Stoffwechselfparameter.....	126
IV - 4.5. Energiebilanz (Futteraufnahme und Stoffwechselrate).....	127
IV - 4.6. Orexigene und anorexigene Substrate der NEP	128
IV - 4.7. Zusammenhang von NEP-Aktivität und Körpergewicht.....	129
V. SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK	133
VI. SYNOPSIS.....	138
LITERATURVERZEICHNIS	141
ANHANG	157
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS (AUSWAHL).....	157
DANKSAGUNG.....	159
PUBLIKATIONEN.....	160
LEBENS LAUF	162
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	163

I. EINLEITUNG

Hauptsächlicher Gegenstand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist das Enzym Neutrale Endopeptidase (NEP, EC 3.4.24.11). Als ein im menschlichen und Säugetier-Organismus weit verbreitetes Enzym beeinflusst die NEP eine Vielzahl von physiologischen/pathophysiologischen Prozessen, indem sie endogene Mediatoren mit Peptidstruktur hydrolysiert. Dabei nimmt sie eine Zwischenstellung zwischen hochspezifischen Enzymen und solchen mit sehr geringen Anforderungen an ihre Substrate ein.

Enzyme stellen die mengenmäßig größte Proteingruppe im menschlichen Organismus dar. Sie sind an der Synthese aller körpereigenen Moleküle beteiligt und auch für deren Modifikation und Abbau sind sie vorwiegend zuständig. Von den enzymatischen Abbauvorgängen sind die proteolytischen Prozesse von zentraler Bedeutung für essentielle Lebensfunktionen. Sie bewirken nicht nur den Proteinabbau in Zellen und Körperflüssigkeiten (katabole Funktion), sondern sind auch für die Regulation verschiedenster biologischer Prozesse unentbehrlich (anabole Funktion).

So werden viele Peptide/Proteine zunächst als inaktive Vorstufen synthetisiert und erst unter geeigneten Bedingungen durch eine gezielte limitierte Proteolyse aktiviert. Beispielsweise entsteht das Insulin durch hydrolytische Entfernung eines Peptidfragments aus Proinsulin und das faserförmige Protein Kollagen, das in Haut und Knochen vorkommt, leitet sich vom Prokollagen, einer löslichen Vorstufe, ab. Eine noch wichtigere Funktion erfüllen die proteolytischen Enzyme gleichwohl im Abbau (Katabolismus) der Eiweißmoleküle, bei dem diese in der Regel inaktiviert werden. Darüber hinaus sind von einigen Enzymen in jüngster Zeit zusätzliche, unerwartete Funktionen bekannt geworden. So hat das Angiotensin-Konversionsenzym (*angiotensin-converting enzyme*, ACE) unabhängig von seiner Enzymfunktion einen entscheidenden Einfluss auf die Fertilität [Siems, 03]. Das ACE bildet weiterhin durch Interaktion mit dem Bradykinin-Typ2-Rezeptor wahrscheinlich ein Heterodimer, wodurch es dessen Funktion beeinflusst [Marcic, 99], und das strukturverwandte ACE2 wurde vor kurzem als funktioneller Rezeptor für das SARS-

Protein beschrieben [Li, 03]. Eine Aminopeptidase fungiert als Rezeptor für das Angiotensin IV [Albiston, 01]. Diese Rezeptorfunktionen könnten sich möglicherweise auch als eine häufige Begleitfunktion von Enzymen herausstellen. Ein Großteil der Rezeptoren kann ohnehin als Enzym-assoziiierter Komplex aufgefasst werden (z. B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosinkinase-Rezeptoren, Rezeptoren mit Guanylatcyclase-Aktivität wie der Rezeptor für das Atriale Natriuretische Peptid).

Nach der von der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) eingeführten EC-Nomenklatur werden die Enzyme in 6 große Klassen eingeteilt:

1. Oxidoreduktasen
2. Transferasen
3. Hydrolasen
4. Lyasen
5. Isomerasen
6. Ligasen

Enzyme, die Peptidbindungen spalten können, Peptidasen und Proteasen also, bilden innerhalb der Hydrolasen die Untergruppe 3.4. Nach ihrem Angriffspunkt im Substratmolekül werden die proteolytischen Enzyme weiter in Endo- und Exopeptidasen unterteilt (Abb. 1).

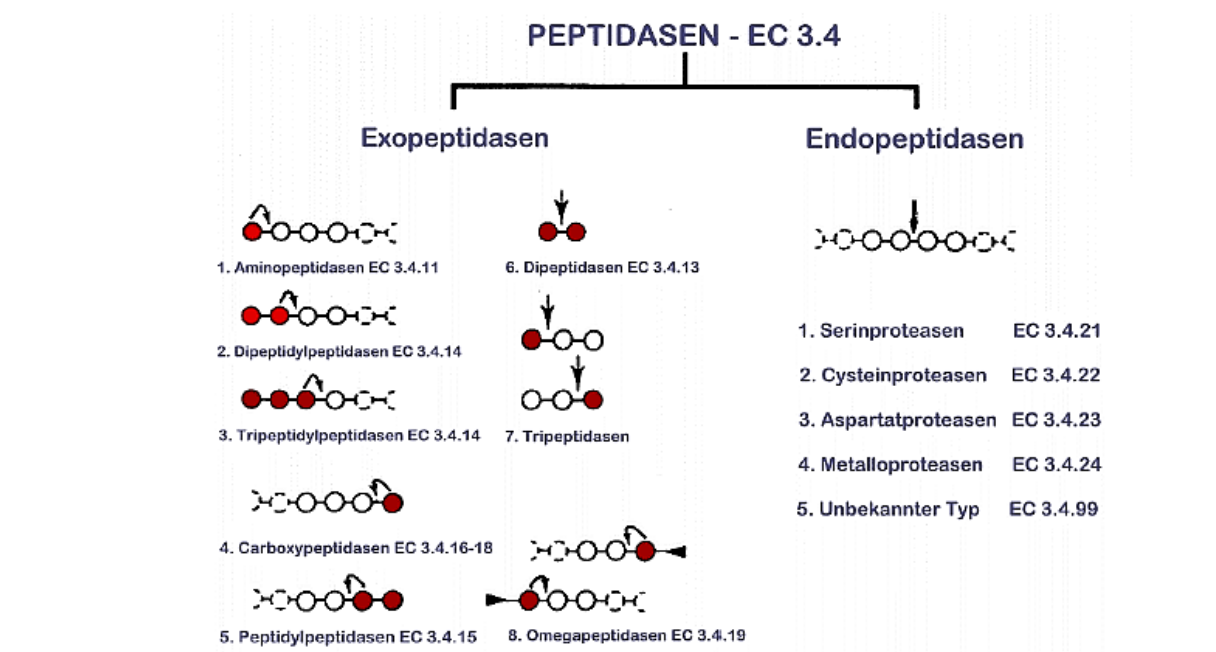


Abb. 1: Klassifikation der Hydrolasen der Untergruppe 3.4 (Peptidasen; modifiziert nach [McDonald, 86])

Endopeptidasen bzw. Proteinasen spalten Peptidbindungen im Inneren von Proteinketten. Sie werden nach dem Bau des aktiven Zentrums weiter in Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen (EC 3.4.21.n bis EC 3.4.24.n und EC 3.4.99.n) unterschieden. Exopeptidasen hingegen greifen Peptide oder Proteine vom C- bzw. N-Terminus der Aminosäureketten her an (= Carboxy- bzw. Aminopeptidasen) und werden nach Substrat, Spaltungsstelle im Substrat oder Reaktionsprodukt in Untergruppen (EC 3.4.11.n bis EC 3.4.19.n) geordnet.

Neben dieser EC-Klassifikation existieren noch weitere, die auf der cDNA-Sequenz der Peptidasen, ihren Strukturdaten oder auf den im aktiven Zentrum befindlichen Aminosäuren basieren [Rawlings, 93]. Entsprechend dieser Ordnung werden Peptidasen erst nach ihrem katalytischen Typ und dann in Familien von evolutionär eng verwandten Enzymen unterteilt:

- Serintyp – 22 Familien (S1-S22)
- Cysteintyp – 14 Familien (C1-C14)
- Aspartattyp – 2 Familien (A1-A2)
- Metallotyp – 25 Familien (M1-M25)
- Unbekannter Reaktionstyp – 21 Familien (U1-U21).

Viele dieser Peptidasen haben eine hohe Substratspezifität, wie dies auch die Eigenschaft einer Vielzahl anderer Enzyme, z. B. der Acetylcholinesterase, ist. Ein Beispiel für eine sehr spezifische Peptidase ist das Renin, das aus Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I abspaltet und dadurch indirekt zur Regulation des Blutdrucks beiträgt. Für dieses Enzym sind *in vivo* keine weiteren Substrate bekannt. Andere eiweißspaltende Enzyme wirken hingegen wenig spezifisch, wie z. B. die Endopeptidase Trypsin (eine Serinprotease) oder eine Reihe von Amino- und Carboxypeptidasen. Diese unspezifischen Enzyme sind folglich im Körper auch nicht für biologische Steuerungsprozesse zuständig, sondern meist am Abbau von Eiweißen der Nahrung im Duodenum oder am allgemeinen, unspezifischen Protein-Turnover beteiligt.

Es gibt allerdings auch peptidolytische Enzyme, für die nach ihrer Entdeckung im Laufe der Zeit immer mehr Substrate bekannt wurden, ohne dass sie deshalb als unspezifisch angesehen werden. Derartige Enzyme benötigen oftmals lediglich eine bestimmte Aminosäuresequenz an der Spaltstelle der betreffenden Substrate oder

stellen Anforderungen an deren Größe; häufig sind sie mit dem Wirkort ihrer Substrate kolokalisiert oder sind auf die Hydrolyse von Peptiden mit einem ähnlichen Wirkungsspektrum spezialisiert. Inzwischen sind viele solcher Enzyme bekannt und eines, das in großem Maße mit zu diesem Bild beigetragen hat, ist die NEP.

Diese Metallopeptidase ist im Körper von Säugetieren weit verbreitet und ist *in vivo* für die Spaltung einer Vielzahl von Peptidhormonen bzw. –neurotransmittern verantwortlich, die oft aus nicht mehr als 10 bis 15 Aminosäuren bestehen wie beispielsweise Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, Substanz P, Bradykinin oder Cholecystokinin (CCK). Allerdings sind auch größere Substrate der NEP bekannt, wie das Atriale Natriuretische Peptid (ANP, 28 Aminosäuren) oder das Neuropeptid Y (NPY, 36 Aminosäuren), darüber hinaus auch Peptide, die weder Neurotransmitter sind noch Hormoncharakter haben, wie das Alzheimer-Peptid β -Amyloid (42 Aminosäuren).

Über ihre Substrate und möglicherweise auch durch andere, nicht-enzymatische Funktionen hat die NEP Einfluss auf vielfältige physiologische Vorgänge. Bei Entgleisung dieser Prozesse – sei es direkt durch Veränderungen auf Ebene der NEP oder ihrer Substrate oder indirekt durch andere Faktoren – kann es zu pathologischen Veränderungen im Körper kommen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Beziehung der NEP zu drei veränderten Körperfunktionen mit Krankheitswert – 1. der Alzheimerschen Erkrankung, 2. einem pathologisch gesteigerten Alkoholkonsum sowie 3. der Adipositas (Fettleibigkeit).

I - 1. ÜBERBLICK ÜBER DIE NEP

I - 1.1. Geschichte

Die NEP wurde erstmalig als eine unbekannte Aktivität in der Bürstensaummembran von Rattennieren beschrieben. Präparationen daraus hydrolysierten *in vitro* bei neutralem pH-Wert die B-Kette des Insulins [Wong-Leung, 68]; das Enzym wurde deshalb *kidney brush border neutral proteinase* genannt. Es wurde 1974 aus Rattennieren homogen aufgereinigt [Kerr, 74] und als Metallopeptidase erkannt. Die NEP macht ungefähr 4% der Proteinmasse der Bürstensaummembran der Niere aus.

Die weitere Charakterisierung der NEP ergab große Übereinstimmungen mit den Eigenschaften der bakteriellen Metallopeptidase Thermolysin, u. a. hemmte der Thermolysin-Inhibitor Phosphoramidon auch die NEP (K_i 2 nM; [Kenny, 77]). Unabhängig davon wurde die NEP auch in Hirnmembranen entdeckt und wegen seiner inaktivierenden Wirkung auf Enkephaline als „Enkephalinase“ bezeichnet [Malfroy, 78].

1987 wurde das Enzym kloniert und sequenziert [Devault, 87], woraus die Identität mit dem Leukozyten-Oberflächenantigen *common acute lymphoblastic leukemia antigen* (CALLA oder CD 10) erkannt wurde [Letarte, 88]. 1992 hat die IUBMB wegen der vielfältigen Bezeichnungen für diese Peptidase den Namen Neprilysin vorgeschlagen.

I - 1.2. Struktur und Moleküleigenschaften

Als integrales Membranprotein vom Typ II ist die NEP in der Plasmamembran verankert mit Orientierung des Aminoterminus zum Zellinneren und des Carboxyterminus zum Extrazellularraum. Der größte Teil des Moleküls inklusive des katalytischen Zentrums befindet sich im Extrazellularraum, weshalb man auch von einem Ektoenzym spricht. In den meisten Spezies existiert die NEP als nichtkovalent assoziiertes Homodimer [Fulcher, 83]. Im Zentralnervensystem (ZNS) ist sie meist auf axonalen Membranen und in der perisynaptischen Region der Neuronen prä- und postsynaptisch lokalisiert, oft in räumlicher Nähe mit dem Produktionsort ihrer Substrate oder mit deren Rezeptoren. Deshalb wird die NEP im ZNS auch als „Cholinesterase der peptidergen Synapsen“ bezeichnet [Turner, 03].

Die Molmasse der NEP variiert in den verschiedenen Geweben von ca. 85 bis 100 kDa, abhängig vom Ausmaß der Glykosylierung an 5 bis 6 Glykosylierungsstellen. Mindestens 4 Disulfidbrücken innerhalb des Proteins sind wichtig für die Aufrechterhaltung von Struktur und Aktivität [Tam, 85]. Insgesamt 12 Cysteine sind im Molekül enthalten, von denen 10 innerhalb der gesamten M13-Familie der Metallopeptidasen konserviert sind.

Die M13-Familie ist charakterisiert durch 2 Zink-bindende Domänen innerhalb der letzten 250 Aminosäuren der extrazellulären, C-terminalen Region. Diese beiden Sequenzen, eingebaut in 3 α -Helices und 4 β -Faltblattstrukturen, bewirken die

Koordination des Zinkions. Die Peptidasen der M13-Familie besitzen im Gegensatz z. B. zum ACE nur ein katalytisches Zentrum. Außer der NEP gehören der M13-Familie so bedeutende Enzyme wie die Endothelin-Konversionsenzyme 1 und 2 (*endothelin-converting enzyme*, ECE-1 und -2), aber auch weniger bekannte Peptidasen, deren Funktion bis heute noch relativ unbekannt sind, wie das KELL-Blutgruppen-Antigen, „Phosphat-regulierendes Genprodukt mit Homologien zu Endopeptidasen auf dem **X**-Chromosom“ (PEX), die „Orphan“-Peptidase XCE (*X-converting enzyme*, neuere Bezeichnung ist ECE-like 1, ECEL-1), die lösliche Endopeptidase (*soluble_oder secreted endopeptidase*, SEP, bzw. *neprilysin-like enzyme 1*, NL-1, in der Ratte als NEP 2 bezeichnet), und DINE (*damage-induced neuronal endopeptidase*, evtl. das orthologe Enzym der Ratte zum menschlichen XCE) an. Seit längerem bekannt und auch in die M13-Familie gehörend ist das bereits erwähnte bakterielle Enzym Thermolysin, das wegen seiner gut aufgeklärten Struktur und Substratspezifität oft zu Vergleichen mit der NEP und anderen Mitgliedern der M13-Familie heran gezogen wird.

Die Identifikation der NEP als Enkephalinase und die Bemühungen um eine Potenzierung der Enkephalin-Wirkungen waren Anlass für die Entwicklung des potenten Inhibitors Thiorphan [Roques, 80], der zunächst oft zur Unterscheidung der NEP von anderen Mitgliedern der M13-Familie der Metallopeptidasen herangezogen wurde. Da Thiorphan außer Thermolysin und der NEP aber auch eine Reihe weiterer Enzyme hemmt, ist die Verwendung neuerer Inhibitoren wie Candoxatrilat – das in den üblicherweise verwendeten Konzentrationen keins der NEP-verwandten Enzyme hemmt – vorteilhafter.

Das Gen für die NEP existiert in einer einzelnen Kopie, umspannt mehr als 80 kb, besteht aus 24 Exons und ist innerhalb der Säugetiere hochkonserviert [D'Adamio, 89]. Es wurde 1989 auf der chromosomalen Region 3q21-q27 lokalisiert [Barker, 89]. Neuere Untersuchungen haben die Region auf 3q25.1-25.2 eingegrenzt [GeneCards, 04]. Die Klonierung der cDNA ergab bei den untersuchten Säugerspezies relativ einheitliche Moleküllängen: 750 Aminosäuren beim Kaninchen [Devault, 87], 742 Aminosäuren bei der Ratte [Malfroy, 87] und 752 Aminosäuren für die menschliche NEP [Malfroy, 88].

Die N-terminale, cytoplasmatische Domäne der humanen NEP besteht aus 27 Aminosäuren, gefolgt von der transmembranalen Domäne mit 22 hydrophoben

Aminosäuren und der großen extrazellulären Domäne einschließlich des katalytischen Zentrums mit insgesamt 703 Aminosäuren. Der C-Terminus des Enzyms beinhaltet das für viele Zink-Peptidasen typische HExxH-Motiv. Die beiden Histidine in diesem Motiv (His⁵⁸³ und His⁵⁸⁷) und das Glutamat in Position 646 bilden die Zink-komplexierenden Elemente. Das Glutamat in Position 584 (innerhalb des HExxH-Motivs) ist bei Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe in P2'-Position des Substrates (2. Aminosäure C-terminal der Spaltstelle, s. unten) in der Lage, diese Gruppe zu stabilisieren und damit die Katalyse zu begünstigen. Auch die Aminosäuren Arg¹⁰², Asn⁵⁴², Asp⁶⁵⁰, His⁷¹¹ und Arg⁷⁴⁷ sind für die Funktion der NEP essentiell oder zumindest Katalyse-beschleunigend, sei es durch Interaktion mit dem Substrat oder durch Stabilisierung des Übergangszustandes während der Reaktion.

I - 1.3. Aktivität und Spezifität

Die NEP ist über einen großen pH-Bereich aktiv; das pH-Optimum wird meist mit ca. pH 6-7 angegeben. Das Substratspektrum der NEP ist – wie oben erwähnt – außergewöhnlich breit. In einem Großteil der Substrate ähnelt es dem der bakteriellen Zink-Metalloproteinase Thermolysin, welche sich ebenfalls durch Phosphoramidon hemmen lässt. Die NEP wirkt im Wesentlichen als Oligopeptidase, für die die Hydrolyse von Peptiden mit bis zu 42 Aminosäuren nachgewiesen ist, wobei die Effektivität der Hydrolyse mit zunehmender Länge der Peptide im Allgemeinen abnimmt. Eins der am schnellsten hydrolysierten Substrate ist das Undecapeptid Substanz P ($K_m = 31,9 \mu\text{M}$, [Matsas, 84]). Eine Ausnahme von der steigenden Effektivität bei kürzeren Substraten bildet das β -Amyloid-Peptid, das von der NEP mit einem K_m -Wert von $2,8 \mu\text{M}$ hydrolysiert wird [Takaki, 00].

Die Substratspezifität der NEP wurde *in vitro* anhand eines großen Spektrums an synthetischen und natürlichen Peptidsubstraten ausführlich untersucht, wohingegen die Liste der Moleküle, bei deren Abbau für die NEP auch *in vivo* eine bedeutende physiologische Rolle eindeutig belegt werden konnte, bisher limitiert ist. Zu den NEP-Substraten, für die auch aus *In-vivo*-Experimenten klare Beweise für einen NEP-bedingten Katabolismus existieren, gehören die Enkephaline, Tachykinine wie Substanz P, ANP und das β -Amyloid-Peptid. Für Bradykinin, Neurotensin, das chemotaktische Peptid *formyl-Met-Leu-Phe*, Gastrin, Bombesin und einige andere

Peptide konnte neben der *In-vitro*-Spaltung auch die gemeinsame immunhistochemische Anfärbung *in situ* gezeigt werden.

In Abbauversuchen *in vitro* wurde die Substratspezifität der NEP hingegen ausführlich untersucht. Aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen sind neue, potentielle Substrate zwar nicht mit Sicherheit vorhersagbar, jedoch lassen sich daraus einige grundsätzliche Anforderungen an solche Peptide und orientierende Merkmale für potentielle Spaltsequenzen innerhalb von Peptiden ableiten. Endogene Peptide, die die entsprechenden Strukturmerkmale aufweisen, können dann auf Hydrolyse durch die NEP getestet werden. Es stellt daher einen viel versprechenden Ansatz dar, für einen physiologischen/pathophysiologischen Vorgang, bei dem ein Zusammenhang mit der NEP vermutet wird oder erwiesen ist, eine Liste der darin involvierten Peptide systematisch auf mögliche Kandidaten einer Spaltung durch die NEP zu durchsuchen und diese anschließend experimentell zu analysieren. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt und im Ergebnis neue *In-vitro*-Substrate der NEP aufgefunden.

Die primäre Voraussetzung für die Spezifität der NEP ist ein raumgreifender hydrophober Aminosäurerest in der P1'-Position des Substrates (Aminosäuren N-terminal der Spaltstelle des Substrates werden mit P bezeichnet und interagieren mit der S-Bindungstasche des Enzyms, wohingegen die Aminosäuren C-terminal der Spaltstelle mit P' und die gegenüberliegende Stelle des Enzyms mit S' bezeichnet wird). *Leu* in der P1'-Position ergibt die höchsten Hydrolyseraten, *Phe* die niedrigsten K_m -Werte [Turner, 98]. Auch *Tyr* ist eine der bevorzugten Aminosäuren in der P1'-Position, mit Einschränkungen auch *Val*.

Eine freie Carboxylgruppe in der P2'-Position bewirkt ebenfalls höhere Hydrolyseraten, da das Arg^{102} der NEP mit dem Carboxylrest eine schwache Salzbrücke bildet [Dion, 97]. Die NEP zeigt in diesem Fall Peptidyldipeptidase-Charakter, ein Beispiel hierfür ist das [Leu]-Enkephalin *Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu* mit Spaltung an der *Gly-Phe*-Bindung. Wenn die Aminosäure in P2'-Position zusätzlich hydrophoben Charakter hat [Quay, 94], ergeben sich sehr schnelle Abbaukinetiken, wie beim [Leu]-Enkephalin ($k_{cat}/K_m = 43,9 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Die Bezeichnung „Neutrale Endopeptidase“ deutet jedoch darauf hin, dass es Peptide gibt, die die Anforderung nach einer freien Carboxylfunktion in P2'-Position nicht erfüllen und dennoch ausgezeichnete NEP-Substrate sind. Inzwischen ist eine größere Anzahl an NEP-

Substraten mit mehreren Aminosäuren C-terminal des P1'-Restes bekannt. Dies weist auf eine größere S2'-Bindungstasche hin, die wahrscheinlich wenigstens 4 weitere Aminosäuren aufnehmen kann. Mittlerweile wurden sogar so große NEP-Substrate gefunden wie das β -Amyloid-Peptid aus den Alzheimer-Plaques, das 42 Aminosäuren lang ist und C-terminal der hauptsächlichen NEP-Spaltstelle 33 Aminosäuren zählt. Diese C-terminalen Peptidketten können natürlich nicht mehr von der Bindungstasche aufgenommen werden, und reichen aus dem Molekül heraus. Wegen sterischer Hinderungen ist dies nur bei einer begrenzten Anzahl an Peptiden möglich.

Das kleinste identifizierte NEP-Substrat ist das chemotaktische Peptid *formyl-Met-Leu-Phe*, (mit Spaltung an der Met+Leu-Bindung, $K_m = 59 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 3654 \text{ min}^{-1}$) [Connelly, 85]). Weitere gut charakterisierte Substrate und ihre Hauptspaltstellen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Es gibt verschiedene fluorimetrische und colorimetrische Analysenverfahren zur Bestimmung der NEP-Aktivität, meist unter Verwendung synthetischer Substrate. In der vorliegenden Arbeit wird der Abbau von [D-Ala²,Leu⁵]-Enkephalin (DALEK) zur Aktivitätsbestimmung genutzt. Dieses Enkephalinderivat stellt ein sensitives, relativ spezifisches NEP-Substrat dar, bei dem die Hydrolyse durch Aminopeptidasen behindert ist, und das mittels HPLC quantitativ gut erfassbar ist [Winkler, 98].

Tab. 1: Physiologische Peptidsubstrate der NEP

Substrat	Aminosäure-Sequenz mit Spaltstellen	K_m [μM]
[Leu ⁵]-Enkephalin	Tyr-Gly-Gly+Phe-Leu	86,2
[Met ⁵]-Enkephalin	Tyr-Gly-Gly+Phe-Met	62,0
Substanz P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln+Phe+Phe-Gly+Leu-Met-NH ₂	31,9
Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro+Phe-Arg	92,2
Neurotensin	Glp-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro+Tyr+Ile-Leu	78,0
CCK-8	Asp-Tyr-Met-Gly+Trp-Met-Asp+Phe-NH ₂	67,4
Angiotensin I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro+Phe-His-Leu	n. b.

Wichtige physiologische Peptidsubstrate der NEP, deren hauptsächliche Spaltstellen und kinetischen Konstanten. Die K_m -Werte wurden aus der Arbeit [Matsas, 84] entnommen. Das Symbol + bezeichnet nachgewiesene initiale Spaltstellen. (n. b.: nicht bekannt).

Die im Jahr 2000 veröffentlichte Röntgenkristallstruktur der extrazellulären Domäne der humanen NEP bei 2,1 Å im Komplex mit Phosphoramidon hat viele der früheren Erkenntnisse aus Proteinchemie und Molecular Modelling bestätigt [Oefner, 00]. Sie

hat aber auch neue Aspekte der NEP-Struktur aufgezeigt und ein wesentlich detaillierteres Verständnis der Substratbindung sowie des katalytischen Mechanismus, vor allem aber ein effektiveres Design neuer Inhibitoren ermöglicht [Sahli, 04]. Die extrazelluläre NEP-Domäne besteht aus zwei separaten α -helikalen Untereinheiten, die durch verflochtene Peptidsegmente mit einander verbunden sind. Das größere N-terminale Segment (das im intakten zellgebundenen Enzym dem transmembranären Anker folgt) enthält die Zink-bindende Domäne sowie das katalytische Zentrum und zeigt die erwarteten Ähnlichkeiten mit dem bakteriellen Thermolysin (Abb. 2). Diese Zwei-Domänen-Struktur der NEP erklärt auch, warum das Enzym nur als Oligopeptidase arbeitet, während Thermolysin auch Substrate von Proteingröße spalten kann. Die kleinere C-terminale Domäne der NEP, die in Thermolysin fehlt, scheint den Zugang zum katalytischen Zentrum in der N-Domäne auf Peptide unter 50 Aminosäuren zu begrenzen.



Abb. 2: Röntgenkristallstruktur der NEP im Komplex mit Phosphoramidon. Die Grafik wurde von einer Internetdatenbank [The Protein Data Bank, 04] generiert und basiert auf Daten aus der Arbeit [Oefner, 00].

I - 1.4. Vorkommen und biologische Funktionen

Die NEP ist ein weit verbreitetes, wenn auch nicht ubiquitär vorkommendes Enzym auf der Oberfläche von Säugetierzellen. NEP-artige Enzyme kommen auch in

niederen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* vor. Bei Säugern unterliegt das Enzym in bestimmten Zellarten – z. B. auf Lymphozyten – einer entwicklungsabhängigen regulatorischen Kontrolle, in den meisten ist es jedoch konstitutiv vorhanden. Die bei weitem höchste Aktivität weist die NEP in der Bürstensaum-Membran der proximalen Tubuli und Glomeruli der Niere auf. Lunge, Darm, Plazenta, Prostata und der Plexus chorioides des Auges enthalten ebenfalls höhere NEP-Aktivitäten. In vielen weiteren Geweben und Zellarten, wie z. B. im Gehirn (siehe unten), den Ovarien, im Fettgewebe oder im Pankreas, tritt sie mit geringeren Aktivitäten in Erscheinung, kann dort aber ebenso wichtige Aufgaben erfüllen, auf die im Folgenden z. T. näher eingegangen wird. Im Blut und im Seminalplasma kommt die NEP in einer löslichen Form vor. Vermutlich wird sie hier durch unspezifische Abschilferungsprozesse (shedding [Soleilhac, 96]) oder in Analogie zum ACE durch Sekretasen von den Zellmembranen der Blutgefäße bzw. der Leydig-Zellen in den Testes enzymatisch abgelöst.

Die besonders hohe Aktivität der NEP in der Niere und der Lunge versetzt das Enzym in die Lage, wichtige blutdruckregulierende Peptide wie ANP und den stärksten bekannten Vasokonstriktor, Endothelin-1, aus dem Blutkreislauf abzufangen und zu inaktivieren [Kenny, 88; Yamaguchi, 92]. Hierbei zeigt sich das oftmals ambivalente Verhalten der NEP, da das ANP erheblich zur Natriurese und damit zur Senkung des Blutdrucks beiträgt, wohingegen Endothelin-1 durch Verengung der Gefäße blutdrucksteigernd wirkt. Außerdem bewirkt das Enzym die Umsetzung von Angiotensin II zum vasodilatorischen und kardioprotektiven Angiotensin (1-7) und entzieht damit dem Blutkreislauf das vasokonstriktorische Angiotensin II. Aus solchen *in vitro* oder in einfachen physiologischen Abbauversuchen gewonnenen Erkenntnissen lässt sich jedoch nur bedingt die physiologische Hauptwirkung bei Hemmung des Enzyms vorhersagen. Im Fall der NEP-Hemmung zeigte sich eine blutdrucksenkende Wirkung. Der therapeutische Nutzen von NEP-Inhibitoren in der Bluthochdruck-Therapie wurde allerdings deutlich durch kombinierte Inhibitoren (*mixed inhibitors*), so genannte Vasozeptidase-Hemmer, übertroffen. In hypertensiven Tiermodellen sowie in klinischen Studien konnte die Wirksamkeit und Überlegenheit solcher kombinierten Hemmer der NEP und des ACE bzw. von NEP, ACE und ECE gegenüber reinen ACE-Hemmern belegt werden [Rouleau, 00; d'Uscio, 01]. Omapatrilat als erster Vertreter aus der Gruppe der ACE-/NEP-Inhibitoren wurde trotz seiner Überlegenheit gegenüber ACE-

Inhibitoren bezüglich der Blutdrucksenkung wegen einer erhöhten Gefahr von Angioödemem durch die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA nicht zugelassen.

Eine weitere wichtige Funktion übt die NEP beim Metabolismus chemotaktischer und proinflammatorischer Peptide aus, was z. B. bei Entzündungsprozessen der Lunge eine Rolle spielt, bei denen die Aktivität der NEP deutlich reduziert ist [Shipp, 91]. Im Zusammenhang mit Fällen von Prostatakrebs wurde eine dramatische Down-Regulation der NEP beobachtet. Dies legt auch einen Einfluss des Enzyms auf die Tumorgenese nahe [Papandreou, 98]. Die Beziehung der NEP zu leukämischen Erkrankungen ist seit der Identifikation als Oberflächenantigen CALLA (CD10) auf zahlreichen malignen Zellarten bekannt.

Anders als in der Peripherie, wo die NEP in den jeweiligen Organen meist gleichmäßig verteilt vorliegt oder im jeweiligen Organ auf bestimmte Regionen beschränkt ist, weist die NEP im ZNS ein wesentlich feineres Verteilungsmuster auf. Sie ist im Gehirn zwar weit verbreitet, allerdings mit deutlichen regionalen Unterschieden. Relativ hohe Aktivitäten finden sich in Striatum (Nucleus caudatus und Putamen), Tuberculum olfactorium, Substantia nigra, Globus pallidus, Nucleus accumbens sowie in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks. Aber auch in Amygdala, Hippocampus, Hypophyse, Hypothalamus sowie im Stratum moleculare des Kleinhirns kommt sie in moderaten Aktivitäten vor [Roques, 93; Barnes, 88]. Dabei ist ihre Aktivität in den genannten Hirnregionen nicht gleichmäßig verteilt, sondern konzentriert sich innerhalb dieser Strukturen nochmals auf feinere Areale und Substrukturen, in denen sie relativ hohe Aktivitäten erreichen kann. Dieses neuroanatomisch sehr fein strukturierte Verbreitungsmuster, zusammen mit dem ebenfalls auf bestimmte Regionen konzentrierten Verteilungsmuster der endogenen NEP-Substrate, befähigt das Enzym, trotz weiter Verbreitung und großem Substratspektrum, je nach Region eine sehr unterschiedliche und spezifische Wirkung zu entfalten.

Die erste für die NEP erkannte physiologische Funktion überhaupt zeigte sich durch ihre synaptische, perisynaptische und axonale Lokalisation in den genannten ZNS-Regionen, welche ihr erlaubt, die physiologische Wirkung vieler peptidischer Neurotransmitter zu terminieren, die an gleicher Stelle freigesetzt werden oder zu ihren Rezeptoren diffundieren. Besonders trifft dies auf die Enkephaline (bzw. deren

Rezeptoren) und die Substanz P zu, deren Immunreaktivitäten in Striosomen der striatonigralen Nervenbahn, einigen Nervenendigungen in der Substantia nigra sowie weiteren ZNS-Regionen mit der NEP kolokalisiert sind [Waksman, 86; Barnes, 93]. Auch die Inaktivierung von CCK, Bombesin, Neurotensin, NPY oder Somatostatin im ZNS ist an bestimmte, scharf abgegrenzte Hirnregionen gebunden. Diese sehr scharf regionalisierte Kolokalisation des Enzyms mit einem seiner Substrate hat vielfältige Auswirkungen auf spezifische physiologischen/pathophysiologische Prozesse wie Entzündungen, Schmerz, Nahrungsaufnahme oder den Missbrauch suchtauslösender Stoffe.

In den letzten 10 Jahren sind überdies noch zahlreiche weitere Substrate der NEP gefunden worden, die auf vorher nicht bekannte physiologische und pathologische Bezüge zur NEP und damit potentielle therapeutische Angriffspunkte hinweisen. Einige davon werden in den folgenden Kapiteln beschrieben. An dieser Stelle sei lediglich das im ZNS vorkommende β -Amyloid-Peptid erwähnt, das *in vivo* von der NEP abgebaut wird und in den letzten Jahren wegen seiner Rolle bei der Alzheimerschen Krankheit im Mittelpunkt des Interesses vieler Peptidase-Forscher steht.

Aus der großen Anzahl möglicher NEP–Substrat–Interaktionen und den daraus resultierenden vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen dieses Enzyms befasst sich unsere Arbeitsgruppe mit den Auswirkungen der NEP auf das reproduktive System, das Herz-Kreislauf-System, das Körpergewicht, die Alzheimersche Erkrankung sowie die freiwillige Alkoholaufnahme. Viele dieser Untersuchungen wurden erst möglich durch die Verfügbarkeit von NEP-Knockout-Mäusen sowie reinem, löslichem Enzym und hochselektiven NEP-Inhibitoren.

I - 2. ZIELSTELLUNG UND PROBLEMDARSTELLUNG

Die NEP und ihre physiologischen Funktionen werden gegenwärtig auf einigen Teilgebieten – z. B. ihr Einfluss auf die Blutdruckregulation – von zahlreichen Forschungsgruppen und pharmazeutischen Unternehmen intensiv untersucht. Andere, z. T. therapeutisch ebenso viel versprechende Zusammenhänge wurden nach anfänglichen Misserfolgen, die oft auf das Fehlen geeigneter Untersuchungsmethoden zum damaligen Zeitpunkt zurückzuführen waren, nicht

weiter verfolgt. Ziel dieser Dissertation ist es, einige der oben genannten physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, die in einem direkten oder indirekten Zusammenhang mit der NEP stehen und z. T. wenig beachtet werden, vertieft zu analysieren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich zunächst mit zwei pathophysiologischen Vorgängen, bei denen ein Bezug zur NEP bereits bekannt ist – der Alzheimerschen Erkrankung sowie einer gesteigerten Motivation zur Alkoholaufnahme. Anschließend wird ein möglicher Zusammenhang zwischen krankhaftem Übergewicht und der NEP dargestellt, der in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.

In Bezug auf die Alzheimersche Erkrankung ist seit 1995 bekannt, dass die NEP das β -Amyloid-Peptid hydrolysieren kann, welches bei dieser Erkrankung beim Menschen eine wichtige, wenn nicht sogar die ursächliche Rolle spielt. Im Gehirn von Mäusen und Ratten dagegen konnten bisher keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden, die denen bei der Alzheimerschen Erkrankung des Menschen sowie anderer Säugetierarten gleichen. Das β -Amyloid-Peptid dieser beiden Nagetierspezies unterscheidet sich von dem des Menschen lediglich durch 3 Aminosäuren, von denen eine unmittelbar an der initialen Spaltstelle durch die NEP liegt. Ziel des ersten Themenkomplexes war daher, die Abbaugeschwindigkeiten beider Peptidvarianten durch die NEP zu vergleichen und damit Hinweise auf die oben genannten pathophysiologischen Unterschiede zwischen Mensch und Maus/Ratte zu erhalten. Diese Untersuchungen wurden durch eine weitergehende biochemische Charakterisierung der Peptide ergänzt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der Einfluss der NEP auf den Alkoholkonsum unter Nutzung NEP-defizienter Versuchstiere im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren untersucht. Der Einfluss der Peptidase auf suchtrelevante Vorgänge wurde in der Vergangenheit mit dem Wissen um NEP-Substrate wie die Enkephaline oder NPY wiederholt postuliert. Wegen des Fehlens von NEP-Knockout-Tiermodellen bzw. der Probleme mit nicht-invasiven Methoden zur selektiven NEP-Hemmung im ZNS konnte jedoch bis Mitte/Ende der 1990er Jahre nicht geklärt werden, wie das Enzym die Aufnahme von suchtvorstärkenden Substanzen (besonders Alkohol) beeinflusst. Erst mit der Verwendung von NEP-Knockout-Mäusen konnte in unserer Arbeitsgruppe zweifelsfrei belegt werden, dass bei Fehlen dieses Enzyms die freiwillige Aufnahme von Alkohol erhöht ist [Siems, 00]. Die eigenen Versuche bauen hierauf auf und

berücksichtigen insbesondere, wie sich stressrelevante Begleitumstände auf das Verlangen nach Alkohol bei den NEP(–/–)-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen auswirken. Dazu wurde in einem dafür entwickelten Versuchs-Paradigma der Unterschied im freiwilligen Alkoholkonsum zwischen den beiden genannten Maus-Genotypen unter möglichst stressfreien Bedingungen und anschließend nach der Induktion eines definierten Stresses heraus gearbeitet.

Bei den vorgenannten Untersuchungen fiel darüber hinaus auf, dass die NEP-Knockout-Mäuse besonders unter stressarmen Haltungsbedingungen deutlich stärker an Gewicht zunehmen als die Wildtyp-Mäuse. Aus der eingehenden Beobachtung dieses Phänomens entwickelte sich ein dritter Themenkomplex, der schon dadurch eine besondere Bedeutung erhält, dass ein Zusammenhang NEP - Körpergewicht zuvor nicht bekannt war. Außerdem stellt ein krankhaftes Übergewicht bekanntlich ein rapide wachsendes Gesundheitsproblem mit hohen Folgekosten in den entwickelten Industrieländern dar. Ausgehend von der Charakterisierung des übergewichtigen Phänotyps und dem Nachweis eines höheren Fettanteils am Körpergewicht bei den NEP(–/–)-Mäusen wurden erste biochemische, physiologische und metabolische Untersuchungen zur Klärung der molekularen Ursachen dieses Phänomens durchgeführt.

Methodisch gliedert sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich in zwei Teile. Im biochemischen Teil wurden überwiegend Enzymaktivitäts-Studien sowie *In-vitro*-, z. T. aber auch *In-vivo*-Analysen zum Abbau verschiedener Peptide durch die NEP durchgeführt und letztere durch die Untersuchung anderer biochemischer Eigenschaften ausgewählter Peptide komplettiert. Im zweiten Versuchsteil wurden zahlreiche physiologische Parameter zwischen NEP-Knockout-Mäusen und ihren wildtypischen Kontrollen verglichen.

II. NEP UND ALZHEIMERSCHE ERKRANKUNG

Alois Alzheimer (1864 – 1915) und Patientin: „Wie heißen Sie?“ „Auguste.“ „Ihr Mann?“ „Ich glaube Auguste.“ „Ihr Mann?“ „Ach so, mein Mann...“ „Sind Sie verheiratet?“ „Zu Auguste.“ (Krankenakte Auguste D., Archiv der Psychiatrischen Universitätsklinik Frankfurt/Main) [Alzheimer, 06]

II - 1. EINLEITUNG

II - 1.1. Prävalenz und Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung

In den westlichen Industrienationen ist mit der allgemein längeren Lebenserwartung die am häufigsten gestellte neurologisch-psychiatrische Diagnose die Alzheimersche Krankheit. Ihre Prävalenz liegt in diesen Ländern bei etwa einem Prozent der Gesamtbevölkerung, d.h. in Deutschland sind daran mindestens ca. 800.000 Menschen erkrankt; weltweit wird ihre Zahl auf 12 bis 18 Millionen, nach anderen Angaben sogar 30 Millionen geschätzt. Die Zahl der Neuerkrankungen liegt in den Industrieländern bei etwa 0,12% der Gesamtbevölkerung – in der Bundesrepublik bedeutet dies jährlich mehr als 80.000 Menschen. Die Alzheimersche Erkrankung ist auch eine der häufigsten natürlichen Todesursachen – inzwischen steht sie an vierter Stelle. Der größte Teil der Patienten, etwa 80%, werden von ihren Angehörigen bis zu ihrem Tod gepflegt. Nach neuesten Untersuchungen sind mehr als 800.000 Alzheimer-Patienten in Pflegeheimen untergebracht. Bei einem Pflegesatz von 2.250€/Monat ergibt das jährliche Kosten von 2,7 Milliarden € allein für die Pflege in Heimen [Bundesregierung, 96; Beyreuther, 99; Jansen, 04].

Die klinisch stumme Phase der Krankheit – der Zeitraum, in dem histopathologische Merkmale ohne Vorliegen der charakteristischen Demenz-Symptomatik nachweisbar sind – kann Schätzungen zufolge bis zu 30 Jahre dauern, während die anschließende klinische Phase ein bis 20 Jahre dauert. Diese kann jedoch ebenfalls nur geschätzt werden, da der Beginn schleichend ist und ihr Einsetzen meist relativ spät erkannt wird. Charakteristisch für die Erkrankung ist die starke Neurodegeneration, bei der es zu einem 50%igen Verlust von Nervenzellen kommen

kann. Die damit verbundene Schrumpfung des Gehirns ist erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit zu beobachten. Anfänglich ist nur die Anzahl der Synapsen reduziert. Parallel zeichnet sich ein deutlicher Rückgang an Neurotransmittern ab.

Die auffälligsten histopathologischen Kennzeichen sind extrazelluläre herdförmige Substanzeinlagerungen – die so genannten Plaques (Abb. 3A), welche größtenteils aus Fibrillen des β -Amyloid-Peptids ($A\beta$, s. unten) bestehen – sowie intrazelluläre Fibrillenbündel (neurofibrillary tangles, Abb. 3B) aus hyperphosphorylierten Neurofilament-Proteinen (Tau-Proteine).

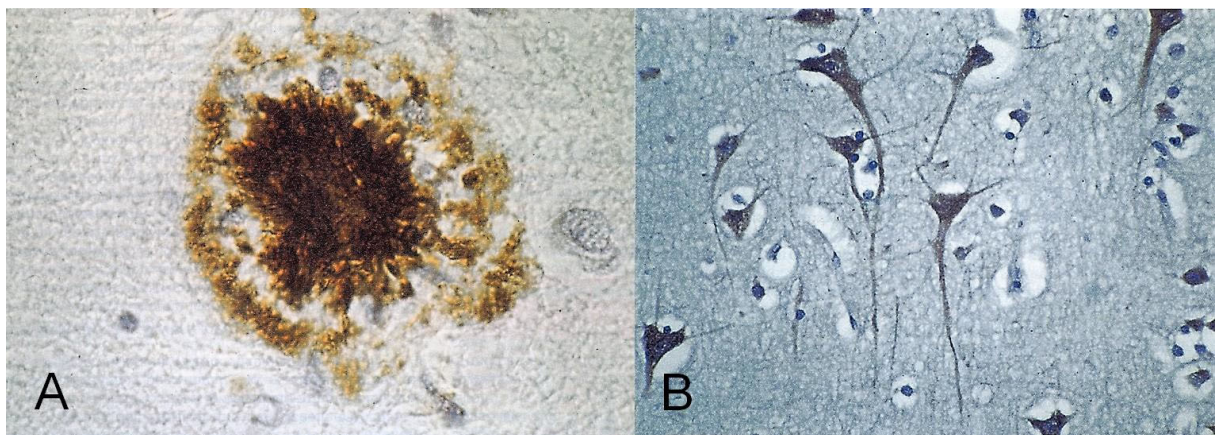


Abb. 3: A: Plaque-Herd, zum großen Teil aus β -Amyloid-Peptid bestehend. B: neurofibrilläre Tau-Bündel (die Aufnahmen stammen aus der AG von Dr. R. Prior, Universitätsklinik Düsseldorf, und wurden freundlicherweise von Frau Dr. B. Urmoneit zur Verfügung gestellt).

Das $A\beta$ -Peptid und die zu einem großen Teil daraus bestehenden Plaques spielen eine wichtige Rolle in der Alzheimerschen Erkrankung. Die Plaque-Ablagerungen, die vorwiegend im Cortex und im Hippocampus, aber auch in Kapillargefäßwänden von Hirnrinde und Hirnhaut zu finden sind, verursachen ab einem gewissen Grad Hirnblutungen, die zu dem schweren neurologischen Erscheinungsbild gegen Ende der Erkrankung beitragen. Das komplexe Geschehen im Gehirn von Alzheimer-Patienten, speziell im Umkreis der Plaques, wird von entzündlichen und oxidativ-zellschädigenden Vorgängen begleitet. Die Plaques werden von Mikroglia- und Astrogliazellen angegriffen – Entzündungen und ein verringerter Energiestoffwechsel im Hirn sind die Folge. Dieses Energiedefizit ist letztendlich eine der Ursachen, die zum Untergang der Nervenzellen führen. Besonders cholinerge Neuronen (vor allem im Nucleus basalis Meynert, von dem etwa 90% der cholinergen Bahnen zum

Neocortex ausgehen) sind davon betroffen. Deren Ausfall bestimmt maßgeblich die Lern- und Gedächtnisstörungen zu Beginn der Erkrankung mit.

A β wird von den meisten Forschern für die Entstehung der Krankheit verantwortlich gemacht bzw. als Ursache für deren pathologische Symptomatik betrachtet. Es gibt jedoch auch ernst zu nehmende Hinweise, die gegen eine hauptverantwortliche Wirkung der A β -Peptide bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung sprechen. Zum Für und Wider der „Amyloid-Hypothese“ seien hier stellvertretend zwei Übersichtsarbeiten genannt [Hardy, 02; Rottkamp, 02]. Da dem Peptid also zumindest eine sehr wichtige, wenn nicht sogar ursächliche Funktion bei der Alzheimerschen Erkrankung zukommt, und weil es eine unbestrittene Beziehung des Peptids zur NEP gibt, sollen diese beiden Aspekte im Folgenden näher betrachtet werden.

II - 1.2. Entstehung und Biochemie des A β -Peptids

Schon 1906 stellte Alois Alzheimer auf der Tagung „Südwestdeutscher Irrenärzte“ das Krankheitsbild als „einen eigenartigen, schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde“ vor und erkannte die extrazellulären Plaques – neben den intrazellulären Neurofibrillenbündeln – in neurohistopathologischen Präparaten als bis heute gültiges diagnostisches Kriterium. 1984 konnte gezeigt werden, dass die Plaques zu einem großen Teil aus dem maximal 43 Aminosäuren langen A β -Peptid (β -Amyloid-Peptid, Abeta, β A4) bestehen [Glenner, 84]. Der kausale Zusammenhang zwischen den amyloiden Ablagerungen und dem Entstehen der Krankheit ist im Detail zwar noch nicht geklärt, wird aber von den meisten Forschern vertreten. Erst in den letzten Jahren wurden Verfahren entwickelt, mit Hilfe derer A β -Ablagerungen bzw. -Konzentrationen und damit letztlich die Krankheit selbst am lebenden Patienten mit höherer Sicherheit diagnostiziert werden kann, z. B. mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie [Pitschke, 98], PET-Scanning [Shoghi-Jadid, 02], A β -Labelling-Methoden [Wengenack, 00] oder Messung von A β bzw. dessen Vorläuferprotein (s. unten) im Plasma [Padovani, 01; DeMattos, 02]. Diese Verfahren sind jedoch noch in der Entwicklung und zum Teil sehr kostenintensiv.

A β wird während des ganzen Lebens produziert, ist in verschiedenen Körperregionen (besonders im Gehirn) zu finden und liegt normalerweise als korrekt gefaltetes

Monomer vor. Wie eine Reihe anderer Proteine auch neigt es jedoch sehr leicht zu Fehlfaltungen, die die Monomeren über verschiedene Übergangszustände zu Fibrillen aggregieren lassen (Abb. 4A-C). Die Bezeichnung Amyloid („stärkeartiges“ Molekül) wird für eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Proteine benutzt und rührt von den Anfärbungsreaktionen mit Kongorot und LUGOL-Lösung sowie der Lichtdoppelbrechung im Polarisationsmikroskop her, die von Rudolf Virchow 1854 für eine Reihe niedermolekularer Proteine beschrieben wurden und auch heute noch als Nachweis verwendet werden. Ein wesentliches gemeinsames Strukturmerkmal aller Amyloide ist der hohe Anteil an β -Faltblattstrukturen innerhalb des Aggregates. Charakteristisch ist auch die typische Fibrillenstruktur – die Tau-artige Verschlingung von makromolekularen Einzelsträngen – unter dem Elektronenmikroskop (Abb. 4A).

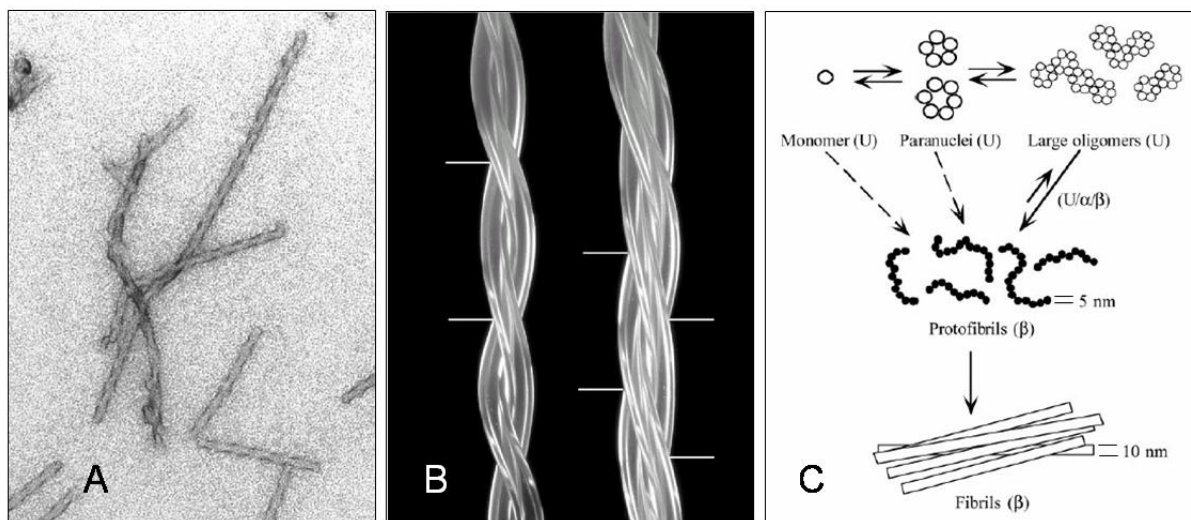


Abb. 4: Amyloidfibrillen.

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines künstlichen, Glutamin- und Asparagin-reichen Peptids.
B: Modell einer Amyloid-Fibrille aus 2 bzw. 3 Einzelsträngen. Beide Abbildungen aus [Perutz, 02]
C: vereinfachtes Modell der Amyloid-Fibrillenbildung: Monomere oligomerisieren sehr schnell zu Paranuclei (in anderen Arbeiten auch als Mizellen bezeichnet). Die Paranuclei können sich dann weiter zu großen Oligomeren („large oligomers“) zusammenlagern. Diese drei Formen sind noch größtenteils unstrukturiert (U), es können aber auch β -Faltblatt-/ β -Turn- und α -helikale Elemente enthalten sein. Aus den großen Oligomeren, vermutlich aber teilweise auch aus Monomeren und Paranuclei, können durch substantielle Konformationsänderungen Protofibrillen entstehen, in denen β -Faltblatt-/ β -Turn-Elemente dominieren. Schließlich können die Protofibrillen zu Fibrillen reifen, ein Vorgang der kinetisch nahezu irreversibel ist. Die Durchmesser der Protofibrillen und Fibrillen sind angegeben, die einzelnen Strukturen sind jedoch nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Modifiziert nach [Bitan, 03a]

Von einer Reihe weiterer Erkrankungen ist bekannt, dass sie ebenfalls durch teilweise massive Anhäufungen von Amyloid-Proteinen im ZNS, aber auch in Organen der Peripherie oder im Kreislauf, gekennzeichnet sind. Bei etlichen dieser Krankheiten ist bekannt, dass Amyloide ursächlich dafür verantwortlich sind. Bei

anderen wurden Amyloid-Proteine bisher lediglich als Begleiterscheinungen beobachtet, werden nun aber aufgrund vieler Übereinstimmungen der Erkrankungen auch als gemeinsame Ursache diskutiert. Tab. 2 zeigt eine Zusammenstellung dieser so genannten Amyloidosen und der mit ihnen in Verbindung stehenden Amyloid-Proteine. Darunter befinden sich seit Längerem als Amyloidosen bekannte Erkrankungen wie die Creutzfeldt-Jacob-Krankheit, aber auch solche wie Diabetes Typ II oder Morbus Parkinson, bei denen erst in den letzten Jahren zumindest eine Beteiligung der Amyloide an der Krankheitsentstehung diskutiert wurde. Viele Erkrankungen des ZNS aber auch der Peripherie könnten demnach einem gemeinsamen ursächlichen Mechanismus unterliegen.

Tab. 2: Amyloidosen

Klinisches Syndrom	Fibrilläres Protein
Sekundäre systemische Amyloidose	Serum Amyloid-A-Protein
Senile systemische Amyloidose	Transthyretin
Insulin-assoziierte Amyloidose	Insulin
Typ-II Diabetes	Amylin (Insel-Amyloid-Polypeptid)
Atriale Amyloidose	Atriales Natriuretisches Peptid
Morbus Alzheimer	A β -Peptid, Tau-Protein
Morbus Parkinson	α -Synuclein
Creutzfeldt-Jacob-Krankheit	Prion-Protein (PrP ^{Sc})
Morbus Huntington	Huntingtin
Amyotrophe Lateralsclerose	Superoxiddismutase

Bekannte und vermutete Amyloidosen sowie die damit verbundenen Amyloid-Proteine [nach Selkoe, 03a].

A β entsteht aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (amyloid precursor protein, APP) durch proteolytische Spaltung. Normalerweise wird das membranständige APP auf dem „nicht-amyloidogenen Weg“ durch α -Sekretasen gespalten, wodurch lösliches APP_s- α entsteht. Der „amyloidogene Weg“ dagegen ist im gesunden Organismus zwar auch aktiv, hat aber eine untergeordnete Bedeutung. Bei diesem Weg wird das APP zunächst durch die β -Sekretase – die inzwischen als das beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1, Überblick in [Vassar, 00]) identifiziert wurde – gespalten, anschließend löst die so genannte γ -Sekretase durch innermembranäre Spaltung das restliche, 39 bis 43 Aminosäuren lange Peptid von der Zellmembran oder intrazellulären Membranen ab (Abb. 5). Normalerweise wird bei dieser Spaltung das unter physiologischen Umständen lösliche A β (1-40) gebildet, neben geringen

Mengen A β (1-39), (1-42) und (1-43). Obwohl das APP und die Amyloid-Peptide während des ganzen Lebens produziert werden ist ihre physiologische Bedeutung immer noch unklar und wurde erst in den letzten Jahren diskutiert [Selkoe, 02b; Opazo, 02; Esteban, 04].

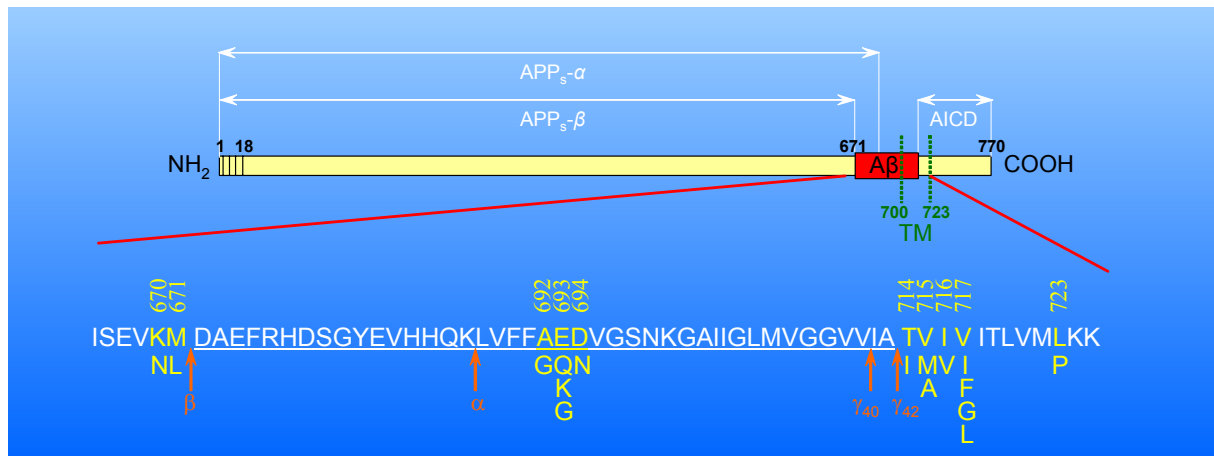


Abb. 5: Schematische Darstellung des humanen APP und des A β -Peptids.

Der obere Teil stellt die größte bekannte Splice-Variante des APP mit 770 Aminosäuren (AS) dar. Am N-Terminus befindet sich eine 17 AS lange Signalsequenz. Die transmembranäre Domäne (TM) befindet sich zwischen den AS 700-723. Das APP kann von verschiedenen Sekretasen spezifisch hydrolysiert werden. Bei initialer Spaltung durch die β -Sekretase (an Position 671/672) und nachfolgender Spaltung durch die γ -Sekretase (hinter AS 711 bzw. 713, auch andere Positionen sind möglich) entstehen die schwer- bzw. unlöslichen A β -Peptide 1–40 bzw. 1–42 (rotes Rechteck, „amyloider Weg“), sowie ein lösliches APP $_{s-\beta}$ (AS 1–671) und die intrazelluläre Domäne AICD (APP intracellular domain, AS 712/714–770). Bei Hydrolyse durch die α -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase („nicht-amyloider Weg“) entstehen nur lösliche Varianten: APP $_{s-\alpha}$ (AS 1–687) und AICD (AS 712/714–770). Die Aminosäuresequenz im Bereich um A β ist im unteren Teil der Abb. näher aufgelöst (die Sequenz von A β ist unterstrichen). Unter der wildtypischen Aminosäuresequenz sind diejenigen bekannten Mutationen gelb aufgezeigt, die bei Patienten mit familiären Alzheimer-Formen oder vererbaren Amyloidosen gefunden wurden. Orange sind die Angriffsstellen der Sekretasen markiert. (modifiziert nach [Selkoe, 02a])

Bei beginnender Alzheimererkrankung tritt der „amyloide Weg“ in den Vordergrund, und die im physiologischen Milieu unlöslichen Peptide A β (1-42) und (1-43) werden – besonders bei den familiären (autosomal-dominant vererbaren) Formen – vermehrt gebildet und lagern sich mit anderen Molekülen aus bis heute nicht vollständig bekannten Ursachen zu den typischen Plaques zusammen. Die Gründe für diese Verschiebung der APP-Spaltung hin zum Anabolismus der A β -Peptide sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Zum einen könnten dafür Mutationen im APP-Gen verantwortlich sein, die bei einem Teil der familiären (vererbaren) Alzheimer-Erkrankungen auftreten. Diese Formen unterscheiden sich allerdings von der spontanen („normalen“) Alzheimer-Demenz: Die ersten Symptome treten bei den familiären Formen wesentlich früher auf – sie machen jedoch nur ca.

5% aller Alzheimer-Fälle aus. Biochemisch gesehen führen die APP-Mutationen zu einer Zunahme des APP selbst und damit auch zur vermehrten Bildung der A β -Peptide. Die Mutationen liegen zum großen Teil im Bereich der Spaltstellen der α -, β - und γ -Sekretasen und könnten damit eine Abnahme der Hydrolyserate durch die α -Sekretase bewirken oder eine Spaltung durch die β - und γ -Sekretasen begünstigen. Die Produktion des zellschädigenden A β (1-42) oder das Verhältnis von A β (1-42) zu (1-40) jedenfalls ist in allen diesen Fällen stark erhöht [Selkoe, 02b]. Das Gen für APP liegt zudem auf dem Chromosom 21, was das vermehrte und frühere Auftreten von Alzheimer-artigen Demenzererscheinungen bei Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) als Gen-Dosiseffekt erklärt [Mann, 88].

Eine weitere Ursache für die Zunahme an A β könnten Aktivierungen der an der APP-Hydrolyse beteiligten Enzyme sein. Unter anderem wurde in Gehirnen von Alzheimer-Patienten – besonderes in Regionen mit erhöhtem Plaque-Anteil – vermehrt γ -Sekretase-mRNA gefunden [Yasojima, 01b]. Die γ -Sekretase wurde nach intensiver Forschung als Multiproteinkomplex charakterisiert, der aus Nicastrin, A β PH-1, Presenilin-1 und PEN-2 besteht [Yu, 00; Francis, 02]. Mutationen im Presenilin-Gen, die einen großen Teil der vererbaren Alzheimer-Formen ausmachen, führen zu einer stark erhöhten Produktion der A β -Peptide und zu einem erhöhten A β -(1-42)/(1-40)-Quotienten [Selkoe, 03b].

Da die bevorzugten Labortiere – Mäuse und Ratten – aufgrund eines anders strukturierten A β -Peptids keine ausgeprägte Alzheimersymptomatik zeigen (siehe unten) wird häufig das Modell hAPP-transgener Mäuse verwendet. Diese überexprimieren humanes APP, bilden folglich humanes A β und zeigen eine früh einsetzende, starke Plaquesymptomatik.

II - 1.3. Abbau des A β -Peptids

Bei der Ergründung der erhöhten A β -Belastung von Alzheimer-Patienten hat sich die Forschung in den letzten Jahren von der alleinigen Untersuchung der anabolen Seite des A β -Peptids gelöst. Mit dem rasch auf einander folgenden Bekanntwerden von A β -katabolisierenden Enzymen in hochrangigen Publikationen wurde zunehmend untersucht, wie sowohl das A β -Peptid als auch die Plaques abgebaut bzw. aufgelöst

werden können und wie sich diese Erkenntnisse zu therapeutischen Ansätze nutzen lassen. Mit Kenntnis dieser Enzyme konnten nun auch ihre Aktivitäten in Gehirnen von Alzheimer-Patienten und bei Tiermodellen der Alzheimerschen Erkrankung untersucht werden. Dabei wurde im Gegensatz zu der erhöhten Aktivität (bzw. erhöhten mRNA- oder Protein-Spiegeln) der A β -generierenden γ -Sekretase eine Erniedrigung von mRNA, Protein oder der Aktivität von A β -abbauenden Enzymen gefunden. So wurde zum Beispiel in den Gehirnregionen von Alzheimer-Patienten, die verstärkte Plaquebildung zeigten, eine stark verringerte NEP-Aktivität festgestellt, während andere Gehirnregionen, in denen pathologische Veränderungen nicht oder erst in sehr späten Stadien der Krankheit auftreten, keine Veränderung der NEP-Aktivität aufwiesen [Yasojima, 01a; Iwata, 02; Carpentier, 02]. Auch für das Insulin-abbauende Enzym (*insulin-degrading enzyme*, IDE, Insulysin) wurde solch eine inverse Korrelation von A β und Enzymaktivität gefunden [Miller, 03]. Zusammengenommen zeugen diese Befunde von der „Schiefelage“, in die die Homöostase von Anabolismus und Katabolismus der Peptide bei familiärer Veranlagung oder beim spät einsetzenden („late-onset“) Typ der Alzheimerschen Erkrankung gerät. Dies führt letztlich zur Akkumulation der Peptide.

Dass die NEP tatsächlich A β hydrolysieren kann, wurde bereits 1995 von Howell gefunden [Howell, 95]. Dieser Zusammenhang erregte allerdings erst im Jahr 2000 nach einer eingehenden *In-vivo*-Untersuchung der Arbeitsgruppe um T. Saido am japanischen RIKEN Brain Science Institute Aufsehen [Iwata, 00]. Iwata et al. konnten nachweisen, dass die NEP unter den Phosphoramidon-sensitiven Peptidasen am effektivsten A β hydrolysiert [Shirotani, 01], mit einem K_m -Wert von 2 μ M [Takaki, 00]. Vermutlich ist das Enzym generell für den A β -Abbau mit hauptverantwortlich [Iwata, 01]. Seit diesen Veröffentlichungen ist der Zusammenhang zwischen der NEP und dem A β -Peptid Gegenstand verschiedener Forschungsansätze.

Neben den geschilderten Versuchen wurde u. a. erfolgreich versucht, NEP-Protein im Zellmodell [Hama, 01] und im ZNS von wildtypischen oder hAPP-transgenen Mäusen durch viralen Gentransfer zu induzieren bzw. in Hirnregionen von NEP-Knockout-Mäusen zu exprimieren [Iwata, 04; Leissring, 03]. Diese Versuche resultierten durchgängig in erniedrigten A β -Spiegeln. In hAPP-transgenen Tieren mit bereits vorhandenen Amyloid-Plaques führte der NEP-Gentransfer sogar zu einer 50%igen Reduktion der Plaques [Marr, 04]. Umgekehrt führte die Injektion von

fibrillärem A β in Gehirne von jungen transgenen Mäusen mit der Alzheimer-verursachenden „schwedischen“ APP-Mutation (swAPP) zu einem Anstieg von NEP-mRNA und -Protein, woraus erniedrigte A β -Spiegel resultierten [Mohajeri, 02]. Dies wird damit erklärt, dass die NEP bei erhöhten A β -Spiegeln verstärkt exprimiert wird, wodurch sich der Abbau verstärkt. Das ist ein Beispiel für eine intakte Homöostase. Bei der Alzheimerschen Erkrankung ist diese Homöostase gestört; trotz erhöhter A β -Konzentration sinkt die NEP-Aktivität.

Ein weiterer Hinweis auf die Rolle der NEP in der Alzheimerschen Erkrankung *in vivo* kommt aus Untersuchungen zu Polymorphismen der NEP und deren Einfluss auf die Krankheit. Bisher waren genetische Beziehungen zu der Erkrankung vor allem von den Presenilinen, dem APP sowie dem Apolipoprotein E (Vererbung des ϵ 4-Allels) bekannt. Versuche, solche Beziehungen auch für die NEP nachzuweisen, waren zunächst erfolglos bis zur Veröffentlichung zweier Arbeiten von 2003 und 2004 [Clarimon, 03; Sakai, 04], in denen eine Beziehung von Polymorphismen des NEP-Gens zur Alzheimerschen Erkrankung festgestellt wurden.

Die NEP ist im Hinblick auf den A β -Abbau das am besten charakterisierte Enzym. Inzwischen wurden jedoch auch andere A β -metabolisierende Enzyme gefunden – ein Großteil dieser Versuche wurde allerdings nur *in vitro* oder am Zellmodell durchgeführt. Für das erwähnte IDE wurde hingegen die Hydrolyse des A β -Peptids nicht nur am Zellmodell bestätigt [Vekrellis, 00], sondern auch beim A β -Abbau *in vivo* (am Mausmodell) scheint sie eine ähnliche Potenz wie die NEP zu besitzen [Leissring, 03]. Eine Übersicht der A β -spaltenden Enzyme und ihrer Angriffsstellen im A β -Molekül ist in Abb. 6 veranschaulicht.

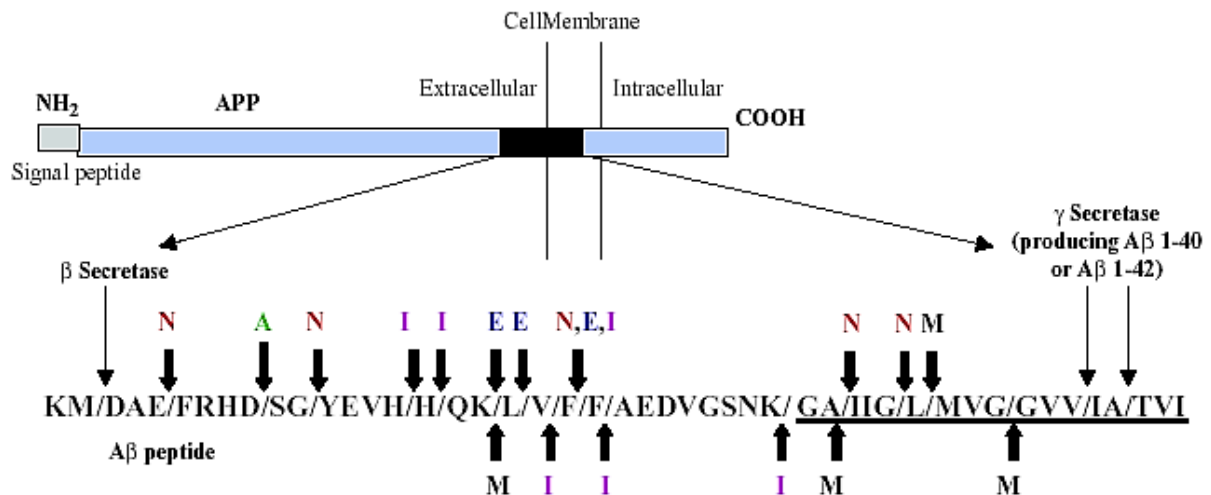


Abb. 6: Spaltstellen innerhalb der Aβ-Sequenz.

In der Literatur beschriebene Spaltstellen sind mit „/“ innerhalb der Sequenz und das betreffende Enzym über- bzw. unterhalb der Sequenz mit einem Buchstaben und der Literatur-Fundstelle markiert. A = ACE [Hu, 01]; E = ECE-1 [Eckman, 01]; I = IDE [Mukherjee, 00]; M = MMP-9, Matrix-Metallopeptidase 9 [Backstrom, 96]; N = NEP [Howell, 95]. Eine Wichtung nach Bedeutung der jeweiligen Spaltstelle wurde nicht vorgenommen. (aus [Carson, 02])

II - 1.4. Problemstellung der Arbeit

Die Beschreibung der NEP als essentieller Aβ-katabolisierender Peptidase einerseits und die Verfügbarkeit von NEP-Knockout-Mäusen sowie des reinen Enzyms andererseits bewegten uns dazu, einige bisher ungeklärte Fragen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der NEP und der Alzheimerschen Erkrankung zu untersuchen.

Wie beschrieben gibt es klare *Post-mortem*-Unterscheidungskriterien zwischen der Alzheimerschen Krankheit und anderen Demenzerkrankungen. Diese pathologischen Merkmale konnten bereits bei verschiedenen Säugetieren festgestellt werden [Johnstone, 91], nicht jedoch bei Mäusen und Ratten [Vaughan, 81] (die manchmal gebrauchte Bezeichnung „bei Nagern“/“rodents“ sollte nicht verwendet werden, da zumindest Meerschweinchen Alzheimer-Merkmale ausprägen können). Auch wenn Mäuse und Ratten Demenzerkrankungen bekommen können, so fehlen Ihnen doch die charakteristischen Plaques. Es könnte dafür verschiedene Gründe geben – unsere Annahme war daher, dass die NEP das murine Peptid schneller spaltet als das menschliche und die resultierende geringere Aβ-Konzentration dazu beiträgt,

dass sich eine der menschlichen vergleichbare Alzheimersche Erkrankung bei Ratten und Mäusen nicht ausbildet.

Murines A β unterscheidet sich in drei Aminosäuren vom humanen Peptid [Johnstone, 91] (Abb. 7). In Position 5 ist *Arg* gegen *Gly* ausgetauscht, *Tyr* gegen *Phe* in Position 10 und *His* gegen *Arg* in Position 13. Die Peptidbindung zwischen *Gly*⁹ und *Tyr*¹⁰ ist – wie oben beschrieben – für den Katabolismus des humanen A β durch die NEP die initiale Spaltstelle. So war es nahe liegend zu untersuchen, ob die murine *Gly*⁹–*Phe*¹⁰-Bindung von der NEP besser gespalten werden kann als die im humanen A β enthaltene *Gly*⁹–*Tyr*¹⁰-Bindung. Die *Gly*–*Phe*-Bindung ist eine bevorzugte Spaltstelle der NEP, wie sie z. B. in der schnellen Spaltung der Enkephaline zum Ausdruck kommt. Die hydrolytische Spaltung aminoterminal von *Tyr* ist jedoch ebenfalls möglich, da auch sie eine große und hydrophobe Aminosäure darstellt.

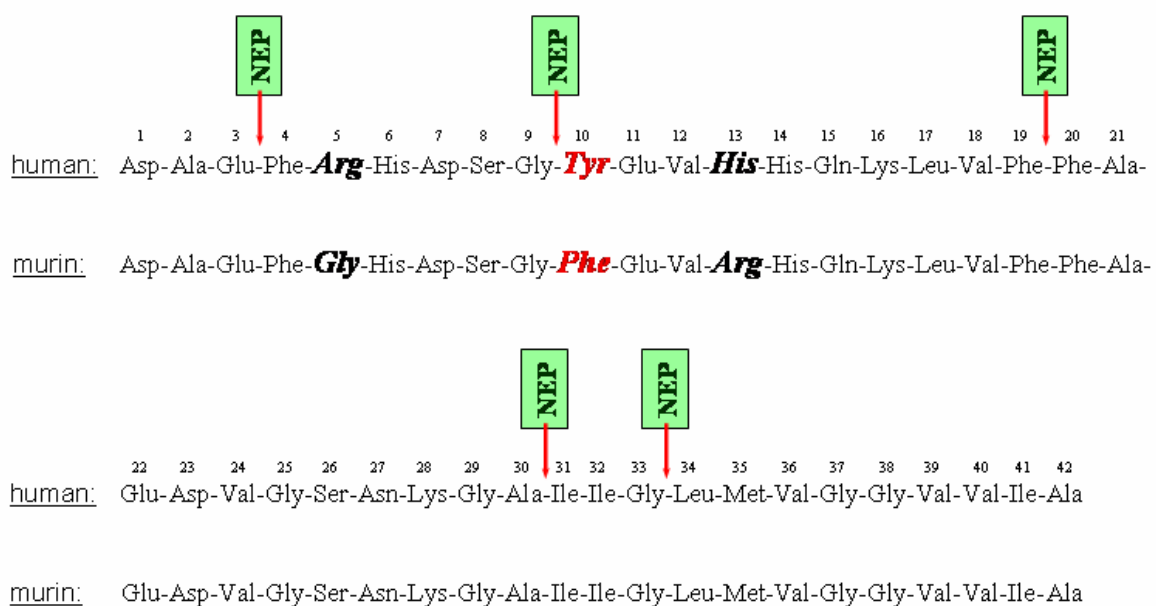


Abb. 7: Vergleichende Gegenüberstellung des humanen und murinen A β (1-42).

Die drei unterschiedlichen Aminosäuren sind fett/kursiv gedruckt, die für die Spaltung durch die NEP relevante ist zusätzlich rot gedruckt. Die Spaltstellen durch die NEP wurden aus der Arbeit von Howell et al. übernommen [Howell, 95]. Weitere, von uns detektierte Spaltstellen werden im Ergebnisteil beschrieben.

Ziel der Untersuchungen war folglich, die Abbaugeschwindigkeiten der beiden Peptide durch die NEP zu vergleichen. Da sich die drei unterschiedlichen Aminosäuren im A β relativ nah bei einander befinden und die quantitative Handhabung des A β -(1-42)-Peptids mit praktischen Schwierigkeiten verbunden ist,

wurden diese Untersuchungen zusätzlich mit der Teilsequenz (4-15) durchgeführt. Um ein evtl. verändertes Hydrolysemuster zu untersuchen, wurden die Spaltprodukte mithilfe der HPLC getrennt und durch Massenspektrometrie identifiziert.

Ein weiterer Grund für das Fehlen von Plaques in Mäusen und Ratten könnte überdies in einer Unfähigkeit des murinen Peptids zur Amyloid-Fibrillenbildung liegen. Um dies zu überprüfen, wurde die Fibrillenbildung sowohl des murinen als auch des humanen Peptids (als Kontrolle) unter dem Elektronenmikroskop verglichen. Auf die Bedeutung dieser Beobachtungen für das Ausbleiben von Plaques und anderen Symptomen der Alzheimerschen Erkrankung bei Mäusen und Ratten wird in der Diskussion ausführlich eingegangen.

II - 2. METHODEN

II - 2.1. Peptide

Die murine bzw. die humane Variante des A β -Peptids (1-42) (mA β (1-42) bzw. hA β (1-42)) sowie die entsprechenden Teilsequenzen mA β (4-15) und hA β (4-15) wurden freundlicherweise von der AG Peptidsynthese (bei M. Beyermann) am FMP mittels Festphasen-Synthese an einem automatisierten MilliGen 9050 Peptid-Synthesizer (MilliGen/Bioscience, Burlington, MA, USA) hergestellt. Sie wurden mittels präparativer RP-HPLC (C18) und einem Acetonitril-/ Trifluoressigsäure(0,1%)-Gradienten bei 70°C Säulentemperatur gereinigt. Nach Lyophilisation wurde ihre Identität über MALDI-Massenspektrometrie (Voyager-DE STR, Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) bestätigt. Genauere Angaben zum Verfahren finden sich in [Janek, 01]. Bis zur Benutzung wurden die Peptide bei -20°C gelagert. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur werden die (4-15)-Peptide hier ebenfalls mit dem Präfix „A β “ versehen, obwohl sie keine amyloidartigen oder β -Faltblatt-Strukturen ausbilden.

II - 2.2. Amyloid-Inkubation

II - 2.2.1. Vorbereitung der Peptide

Eine 2 mM Lösung sowohl des murinen als auch des humanen Peptids A β (1-42) wurde frisch in wasserfreiem DMSO hergestellt. Für die Inkubationen wurden die Lösungen auf 25 μ M mit 50 mM Tris-Lösung pH 9,5 verdünnt (der Anteil an DMSO betrug dann 1,25%), gevortext und anschließend ultraschallbehandelt (Vortex VF2, Jahnke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen i. Br./Deutschland; Ultraschallbad: Transsonic T310, 35 kHz, Elma, Singen/Deutschland). Auch nach jedem Auftauen wurden diese Lösungen zuerst gevortext und für 3 min ultraschallbehandelt; ein Stern (*) im Inkubationsansatz bedeutet ebenfalls nachfolgende Behandlung im Ultraschallbad. Die Lösung im Basischen wurde gewählt, weil die Eigenschaften zur Oligomerisierung, Fibrillenbildung, Neurotoxizität und andere Parameter laut einer Veröffentlichung [Fezoui, 00] besser reproduzierbar sind, wenn die alkalischen Lösungen erst kurz vor der Analyse neutralisiert werden. Die Reaktionen wurden direkt in HPLC-Röhrchen (06-PPCV, Chromacol Ltd., UK/Abimed, Deutschland) mit Bördelkappen R11-oA 1.0mm (Chromatographie Handel Müller, Fridolfing/Deutschland) durchgeführt, die sich in ausführlichen Vorversuchen als am wenigsten A β -adsorbierend erwiesen. Wegen deren Abmessungen war eine Inkubation im Schüttelwasserbad (GFL 1086, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel/Deutschland) nötig. Währenddessen wurden die Röhrchen mit Kappen (incl. Septen) verschlossen. Die Handhabung der (4-15)-Teilsequenzen war wesentlich einfacher: Stammlösungen mit 2 mM wurden in Tris-Lösung pH 7,4 hergestellt und vor der Inkubation 1:10 verdünnt.

II - 2.2.2. Enzyme

Rekombinante humane NEP (rhNEP, Charge GXW01) wurde von R&D Systems (Wiesbaden/Deutschland) bezogen. Die Lösung enthielt 0,368 mg Protein/ml und hatte bei ihrem Eingang eine Aktivität von >250 pmol/min/ μ g, bezogen auf den Umsatz von Mca-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys(Dnp)-OH. Mit „Glycerol-Lösungsmittel“ („Glycerol-LM“) wurde das Lösungsmittel bezeichnet, in dem die rekombinante NEP vorlag. Es bestand aus 50% Glycerol, 50 mM NaCl und 25 mM

Tris-HCl pH 7,5. Mit diesem Lösungsmittel wurde die rhNEP für den Inkubationsansatz im Verhältnis 1:30 verdünnt (rhNEP „1:30“).

Aufgereinigte lösliche NEP wurde aus bovinem Seminalplasma wie folgt hergestellt: Seminalplasma vom Eber wurde bei 80.000 g für 7 min zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde mit vier Teilen Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,6 verdünnt und bei 80.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach auf ein HPLC-System von Perkin Elmer Applied Biosystems (Workstation Vision) mit einer 20 HQ Anionenaustauscher-Säule bei einer Flussrate von 10 ml/min aufgetragen. Die Trennung wurde mit einem Stufengradienten von 0, 50, 100, 150 und 600 mM NaCl in Tris-HCl-Puffer 50 mM pH 7,6 ausgeführt. Es wurden vier Fraktionen nach 11,5; 12,4; 13,3 und 14,2 min erhalten, die bei den längeren Retentionszeiten steigenden Proteingehalt und erhöhte NEP-Aktivität aufwiesen. Die letzten zwei Fraktionen wurden vereinigt und durch SDS-PAGE und Western-Blotting auf Begleitprodukte und Identität analysiert. Der Proteingehalt und die NEP-Aktivität (Beschreibung s. Kap. III - 2.3) der so entstandenen Lösung wurden mit 0,0835 mg Protein/ml bzw. 982 nmol TAG/mg Protein/min ermittelt.

II - 2.2.3. Inkubation

Die Inkubationen der A β -(1-42)-Peptide bzw. der A β -(4-15)-Teilsequenzen wurden nach folgendem Schema vorgenommen:

Lösung	ungehemmt	ohne Enzym	Lösung	ungehemmt	gehemmt
Aβ (1-42) 25 μ M	20 μ l	20 μ l	Aβ (4-15) 0,2 mM	7 μ l	7 μ l
Tris 50 mM pH7,4 (*)	50 μ l	50 μ l	Lisinopril 0,01 mM	10 μ l	10 μ l
HClO ₄ 0,35 M (*)	3,33 μ l	3,33 μ l	Bestatin 1 mM	10 μ l	10 μ l
rhNEP „1:30“ (*)	20 μ l	—	Candoxatrilat 0,1 mM	—	10 μ l
„Glycerol-LM“ (*)	—	20 μ l	Tris 50 mM, pH 7,4	63 μ l	53 μ l
Inkubation (37°C) über die			Aufgereinigte NEP	10 μ l	10 μ l
<u>Stopp</u> : HClO ₄ 0,35 M	20 μ l	20 μ l	Inkubation (37°C) über 0 h, 2 h und 5 h		
MeCN (*)	20 μ l	20 μ	<u>Stopp</u> : HClO ₄ 0,35 M	50 μ l	50 μ l

Bei der Inkubation der (1-42)-Peptide wurden die peptidhaltigen Lösungen nach dem Auftauen möglichst schnell in die Ansätze pipettiert und die Inkubation gestartet. Vor dem Einpipettieren wurde jede Peptidlösung 20x aufgesaugt, um die Pipettenspitze

mit der Lösung abzusättigen. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Kappen abgenommen, die Ansätze mit HClO_4 und Acetonitril (MeCN) versetzt, neue Kappen aufgesetzt, gevortext und sofort eingefroren. Vor der Analyse per HPLC wurde jede Probe einzeln kurz vorher aufgetaut, gevortext, 3 min ultraschallbehandelt und sofort analysiert. Da bei Reaktionsansätzen mit gehemmtem Enzym (und auch ganz *ohne* Enzym) die Konzentration der (1-42)-Sequenzen deutlich abnahm wurde statt des Bezugs auf einen t_0 -Wert der Mittelwert der Inkubationen ohne Enzym (zum jeweiligen Zeitpunkt) mit 100% gleichgesetzt (= 100%-Wert). Die Mittelwerte der ungehemmten Ansätze (zum gleichen Zeitpunkt) wurden darauf bezogen und sind demnach ebenfalls prozentual angegeben.

Bei der Inkubation der (4-15)-Peptide wurden zeitgleich getrennte Inkubationen für jeden Zeitpunkt angesetzt, die Reaktion zum jeweiligen Zeitpunkt gestoppt und zwei Zeitpunkte im Bereich linearer Kinetik zur Auswertung herangezogen. Da die Konzentration auch der (4-15)-Teilsequenzen bei gehemmter Inkubation und langen Reaktionszeiten abnahm (allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als bei den (1-42)-Peptiden), wurden zu jedem Zeitpunkt auch Proben mit Candoxatrilat (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Pfizer, Karlsruhe/Deutschland) in der Endkonzentration 10 μM inkubiert. Candoxatrilat ist der aktive Metabolit des NEP-Inhibitor-Prodrugs Candoxatril. Der Mittelwert der gehemmten Ansätze zum jeweiligen Zeitpunkt wurde (wie oben) mit 100% gleichgesetzt und die ungehemmten Ansätze zum gleichen Zeitpunkt darauf bezogen.

II - 2.3. HPLC-Analytik

Die hochauflösende Flüssigkeits-Chromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) wurde mit einem LC 10-System der Shimadzu Deutschland GmbH/Duisburg durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Shimadzu-Software CLASS-LC 10 herangezogen.

Zur Trennung wurde eine Reversed-Phase-Säule verwendet: Nucleosil 100 C18, Länge X Innendurchmesser 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm , Porengröße 100 Å (VDS Opilab Chromatographie Technik GmbH, Berlin/Deutschland).

Die Signale wurden mit einem UV-Vis-Detektor bei 216 nm detektiert. Als Eluent diente ein Zweikomponenten-Gemisch mit einer 0,1%igen TFA-Lösung als Laufmittel

A (LM A) und MeCN als Laufmittel B (LM B). Die Angaben zu den Chromatographie-Bedingungen werden hier für das jeweilige Peptid – sowohl für die quantitative Bestimmung des Peptidabbaus als auch für die Erfassung der resultierenden Abbauprodukte – kurz aufgeführt (Anteil LM B am Gesamtgemisch, Temperatur der Säule, ungefähre Retentionszeit des Peptid-Peaks bei isokratischem Lauf bzw. gesamte Laufzeit des Gradienten):

Aβ-Peptid	Methode für Peptidabbau (quant.)	Methode für Spaltprodukte (für MS)
murine A β 4-15	17%, 40°C, ca. 8,9 min	12%, 40°C, Lauf über 30 min
human A β 4-15	12%, 40°C, ca. 12,7 min	10%, 40°C, Lauf über 30 min
murine A β 1-42	35%, 40°C, ca. 12,9 min	15-50%, 40°C, Lauf über 45 min
human A β 1-42	33,7%, 40°C, ca. 15,8 min	5-45%, 40°C, Lauf über 45 min

Die Peaks wurden durch Integration (Software: CLASS LC-10, Shimadzu) ausgewertet.

II - 2.4. Massenspektrometrie (MS)

Die bei der Inkubation entstandenen Abbauprodukte wurden manuell nach HPLC-Separation und UV-Vis-Detektion in Glas-Röhrchen aufgefangen. Die Lösungen wurden bis zur Trockne mittels Speedvac (Integrated Speedvac System ISS 100-240, Savant/Life Sciences International GmbH, Frankfurt am Main/Deutschland) eingengt, in 40 μ l eines Gemisches aus MeCN und TFA (0,3%) (1:1) aufgenommen und gevortext. Die Messungen wurden freundlicherweise von H. Lerch und M. Schümann aus der Arbeitsgruppe von E. Krause (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin [FMP]) vorgenommen. Alle Messungen der Bruchstücke der A β -(1-42)-Peptide wurden mittels MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight-Analysator) analysiert. Dafür wurde α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland) als Matrix benutzt und jeweils 1,0 μ l Matrix und 1,0 μ l Probe auf die Probenplatte aufgetragen und co-kristallisiert. Die Matrixmoleküle ermöglichen durch gepulsten Laserbeschuss (Ionisation) niedriger Energie eine schonende Ionisierung der Peptide. Durch die Laserenergie werden dabei zunächst die Matrixmoleküle angeregt und in die Gasphase freigesetzt, dabei gehen auch die Peptidmoleküle als Ionen in die Gasphase über. Anschließend werden die Ionen

unter Vakuum in einem elektrischen Feld beschleunigt und nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis getrennt. Mit dem Time-of-flight-Analysator wurde die Flugzeit der Ionen im linearen Modus, teilweise auch im Reflektron-Modus mit dem Massenspektrometer (Voyager – De STR, Applied Biosystems) gemessen.

II - 2.5. Elektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Proben und die Messungen wurden freundlicherweise in Zusammenarbeit mit M. Ringling (FMP) durchgeführt. Eine 0,2 mM Lösung des humanen bzw. murinen A β (1-42) wurde in hochaufgereinigtem Wasser mit 5% DMSO hergestellt, für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. 5 μ l der jeweiligen Probe wurden auf ein 300-mesh Kupfernetzchen mit Kohlefilm aufgetragen, und nach 60 s wurde der Überstand mit Filterpapier abgesaugt. Die noch feuchte Probe wurde auf dem Netzchen mit 5 μ l einer frisch zubereiteten 2%igen (M/V) Uranylacetat-Lösung negativ kontrastiert. Nach 60 s wurde überschüssige Flüssigkeit entfernt, die Probe luftgetrocknet und anschließend mit einem 902 A-Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen/Deutschland) bei 80 kV untersucht.

II - 2.6. Statistik

Die Abbauversuche wurden mittels t-Test ausgewertet. Die Abweichungen vom Mittelwert sind als SEM (standard error of mean) angegeben.

II - 3. ERGEBNISSE

II - 3.1. Abbauversuche

Abb. 8 zeigt, dass die murinen A β -Sequenzen schneller als die humanen Varianten durch die NEP abgebaut werden. In einer ersten Reihe von Experimenten wurde A β (1-42) mit rekombinanter humaner NEP inkubiert. In der ersten Messreihe wurden nach 6,5 h noch 9,97% \pm 0,59% (n=5) des murinen bzw. 17,32% \pm 1,53% (n=5) des humanen Peptids detektiert (Abbildung nicht gezeigt). Da in diesem Fall

wahrscheinlich schon Substratmangel vorlag, wurde das Experiment mit kürzeren Inkubationszeiten und für die NEP optimalem pH-Wert (6,0) wiederholt. In dieser zweiten Messreihe wurden nach 2,75 h Inkubation vom murinen Peptid noch 28,25% \pm 0,94% des 100%-Wertes und vom humanen Peptid 50,68% \pm 0,97% des 100%-Wertes gefunden. Der Unterschied zwischen diesen beiden Abbauwerten ist hoch signifikant ($P < 0,0001$).

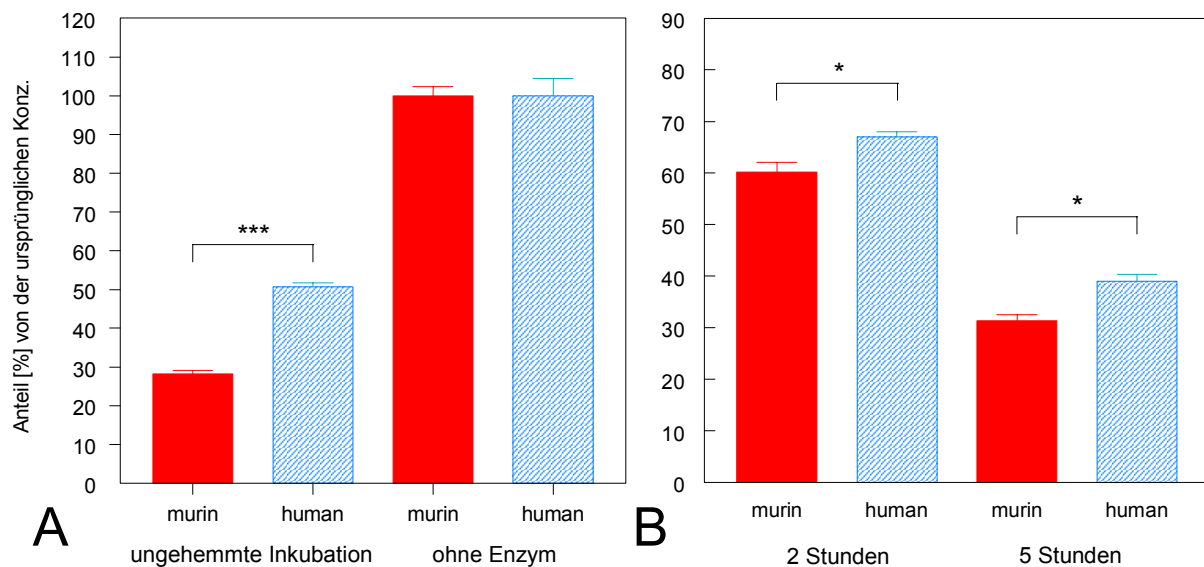


Abb. 8: Abbau der murinen bzw. humanen Aβ-Peptidsequenzen.

A: Inkubation von Aβ (1-42) mit rhNEP („ungehemmte Inkubation“) bzw. ohne Enzym über 2,75 h (murines Aβ: n = 6; humanes Aβ: n = 5).

B: Inkubation von Aβ (4-15) mit aufgereinigter löslicher (boviner) NEP über 2 bzw. 5 h (n = 4).
 ★: $P \leq 0,05$; ★★: $P \leq 0,001$

Da die Handhabung der Aβ (1-42)-Peptide mit beträchtlichen praktischen Schwierigkeiten wie z. B. Adsorption an die Gefäßwand oder spontaner Agglomerat- bzw. Fibrillenbildung verbunden ist, wurden die Ergebnisse noch durch Abbaustudien mit der Teilsequenz Aβ (4-15) bestätigt, die gut löslich ist und keine Agglomerate bildet. Diese Sequenz enthält alle drei zwischen murinem und humanem Aβ verschiedenen Aminosäuren in Position 2, 7 und 10 (entspricht Position 5, 10 und 13 der Gesamtsequenz, siehe Abb. 7). Außerdem wurde statt mit rekombinanter NEP mit löslicher boviner NEP (aufgereinigt aus Seminalplasma vom Eber) inkubiert, um die Ergebnisse auch mit Enzym aus einer natürlichen Quelle und anderer Herkunft als Maus oder Mensch zu belegen. Nach 2 bzw. 5 h wurden Proben entnommen. Auch hierbei (Abb. 8B) zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis. Aus Vorversuchen

war bekannt, dass sich der 2 h-Wert noch im linearen Bereich der Abbaukurve befindet. Nach 2 h wurden noch 60,46% \pm 0,02% des murinen bzw. 67,34% \pm 0,02% des humanen Peptids detektiert ($P = 0,0376$), nach 5 h noch 31,38% \pm 0,03% des murinen bzw. 40,75% \pm 0,02% des humanen Peptids ($P = 0,0301$).

II - 3.2. Massenspektrometrie (MS)

Zur Kontrolle wurden die frisch hergestellten A β (1-42)-Lösungen **vor** der Inkubation mit Hilfe der HPLC aufgetrennt. Dabei wurden auch einige kleinere Peaks aufgefangen und durch MS analysiert. Außer einem kaum detektierbaren Peak, der dem Bruchstück (1-21) entsprechen könnte, wurden keine Signale gefunden, die als Abbauprodukte aus dem Gesamtpeptid hervorgegangen sein könnten. In der HPLC-Fraktion, die dem Gesamtpeptid entspricht, wurde ein MS-Signal mit ungefähr der halben Signalstärke des Gesamtpeptids detektiert und als das am Methionin³⁵ oxidierte A β (1-42) identifiziert.

Anschließend wurden in zwei getrennten Experimenten (Inkubationen wie oben beschrieben) sowohl murines als auch humanes A β (1-42) mit löslicher rekombinanter NEP inkubiert, über HPLC aufgetrennt, deutliche Peaks manuell aufgefangen und per MS analysiert. Neben einer Reihe von Peaks mit geringer Konzentration oder schwer zuzuordnenden MS-Signalen konnten nachstehend aufgeführte MS-Signale einem HPLC-Peak mit mittlerer bis großer Peakfläche zugeordnet werden. Die Berechnung erfolgte mithilfe des online verfügbaren Auswertungs-Tools „FindPept“ auf dem Server von www.expasy.org. Die Bruchstücke sind nach absteigender Größe der korrespondierenden HPLC-Peaks aufgeführt; die Anzahl der Sternchen spiegelt in etwa die Größe des HPLC-Peaks wider. Einige Bruchstücke haben gleiche theoretische Massen. Die aus theoretischer Sicht wahrscheinlicheren Bruchstücke sind in fetter Schriftart hervorgehoben. Die jeweilige Aminosäuresequenz ist dahinter mit Unterstreichung aufgeführt. Bei alternativen Möglichkeiten ist nur die wahrscheinlichere abgebildet. Die drei zwischen humanem und murinem Peptid verschiedenen Aminosäuren sind fett gedruckt. Die jeweils folgende Aminosäure N- und C-terminal von der Spaltstelle ist ohne Unterstreichung in Klammern angegeben.

II - 3.2.1. Inkubation von humanem A β (1-42):

Sequenz 1-42:

Asp¹-Ala²-Glu³-Phe⁴-Arg⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-Tyr¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-Val¹⁸-Phe¹⁹-Phe²⁰-Ala²¹-Glu²²-Asp²³-Val²⁴-Gly²⁵-Ser²⁶-Asn²⁷-Lys²⁸-Gly²⁹-Ala³⁰-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Gly³⁷-Gly³⁸-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²

Sehr große HPLC-Peaks und MS-Signale:

- **(12-17) ***** [(-Glu¹¹)-Val¹²-His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-(Val¹⁸-)] oder (13-18) :
beide Bruchstücke haben die gleiche theoretische Masse; (12-17) ist jedoch wegen des ebenfalls auftretenden (10-17)-Signals und aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität wahrscheinlicher
- **(4-9) ***** [(-Glu³)-Phe⁴-Arg⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-(Tyr¹⁰-)]
- **(31-32) ***** [(-Ala³⁰)-Ile³¹-Ile³²-(Gly³³-)]:
nicht ganz gesichert, da dieses Signal auch in anderen HPLC-Fractionen auftritt sowie wegen theoretischer Überlegungen zur Substratspezifität; evtl. handelt es sich aber um das C-terminale Abbauprodukt von (31-33) (s. dort)
- **(10-17) (incl. Na⁺-Addukt) ** bis *****
[(-Gly⁹)-Tyr¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-(Val¹⁸-)]

Mittelgroße HPLC-Peaks und MS-Signale:

- **(20-30) **** [(-Phe¹⁹)-Phe²⁰-Ala²¹-Glu²²-Asp²³-Val²⁴-Gly²⁵-Ser²⁶-Asn²⁷-Lys²⁸-Gly²⁹-Ala³⁰-(Ile³¹-)]
/ in Assoziation mit (20-29), (20-28) und (20-27)
- **(18-19)** [(-Leu¹⁷)-Val¹⁸-Phe¹⁹-(Phe²⁰-)]: Größe unsicher, da noch andere MS-Signale in dieser HPLC-Fraktion waren (HPLC-Peak hatte Größe von **), MS-Signal ist jedoch intensiv
- **(39-42)** [(-Gly³⁸)-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²]: s. Kommentar bei (18-19)
- **(31-33)** [(-Ala³⁰)-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-(Leu³⁴-)] oder **(40-42)** [(-Val³⁹)-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²] oder (32-34): alle Fragmente haben die gleiche theoretische Masse; (32-34) ist jedoch aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität sehr unwahrscheinlich; das sicher detektierte Signal von (39-42) spricht für (40-42); für (31-33) dagegen spricht, dass bei Howell et al. dieser Peak als eines der drei Hauptbruchstücke bei der Inkubation von A β (1-40) gefunden wurde, aus dem das Peptid (40-42) nicht entstanden sein kann; zur Größe des HPLC-Peaks: s. Kommentar bei (18-19)

Folgende Fragmente konnten nur in einer von zwei Inkubationen detektiert werden, hatten darin jedoch ein sicheres MS-Signal:

- **(1-9) **** [Asp¹-Ala²-Glu³-Phe⁴-Arg⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-(Tyr¹⁰-)]
- **(1-16) **** [Asp¹-Ala²-Glu³-Phe⁴-Arg⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-Tyr¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-(Leu¹⁷-)] oder (12-28): beide Bruchstücke haben die gleiche theoretische Masse; (1-16) ist jedoch aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität wahrscheinlicher
- **(1-17) *** [Asp¹-Ala²-Glu³-Phe⁴-Arg⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-Tyr¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-(Val¹⁸-)]
- **(15-19) **** [(-His¹⁴)-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-Val¹⁸-Phe¹⁹-(Phe²⁰-)]: dieses Fragment tritt in mehreren Fraktionen der 2. Inkubation (mit unterschiedlichen Retentionszeiten) auf; deshalb könnte es sich auch um ein Blank-Signal handeln)

II - 3.2.2. Inkubation von murinem Aβ (1-42):

Sequenz 1-42:

Asp¹-Ala²-Glu³-Phe⁴-Gly⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-Phe¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-Arg¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-Val¹⁸-Phe¹⁹-Phe²⁰-Ala²¹-Glu²²-Asp²³-Val²⁴-Gly²⁵-Ser²⁶-Asn²⁷-Lys²⁸-Gly²⁹-Ala³⁰-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Gly³⁷-Gly³⁸-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²

Sehr große HPLC-Peaks und MS-Signale:

- **(4-9) ***** [(-Glu³)-Phe⁴-Gly⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-(Phe¹⁰-)] oder (5-10) oder (23-28): alle Fragmente haben die gleiche theoretische Masse; (4-9) ist jedoch wegen des starken Signals des humanen Analogons und aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität am wahrscheinlichsten
- **(10-17) (+Na⁺-Addukt)***** [(-Gly⁹)-Phe¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-Arg¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-(Val¹⁸-)]

Mittelgroße HPLC-Peaks und MS-Signale:

- **(10-16) **** [(-Gly⁹)-Phe¹⁰-Glu¹¹-Val¹²-Arg¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-(Leu¹⁷-)] /
in Assoziation mit (10-15) und (10-14) (beide Signale kleiner als (10-16))

- **(12-17) **** [(-Glu¹¹)-Val¹²-Arg¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-Leu¹⁷-(Val¹⁸-)] oder (13-18):
s. Kommentar beim humanen Analogon
- **(18-19)** [(-Leu¹⁷)-Val¹⁸-Phe¹⁹-(Phe²⁰-)]: s. Kommentar beim humanen Analogon
- **(39-42)** [(-Gly³⁸)-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²]: s. Kommentar beim humanen Analogon
- **(20-30) **** [(-Phe¹⁹)-Phe²⁰-Ala²¹-Glu²²-Asp²³-Val²⁴-Gly²⁵-Ser²⁶-Asn²⁷-Lys²⁸-Gly²⁹-Ala³⁰-(Ile³¹-)]
- **(31-32) *** [(-Ala³⁰)-Ile³¹-Ile³²-(Gly³³-)]: s. Kommentar beim humanen Analogon
- **(31-33)** [(-Ala³⁰)-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-(Leu³⁴-)] oder **(40-42)** [(-Val³⁹)-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²] oder (32-34) *: s. Kommentar beim humanen Analogon
- **(10-11) *** [(-Gly⁹)-Phe¹⁰-Glu¹¹-(Val¹²-)] oder (3-4): beide Bruchstücke haben die gleiche theoretische Masse; (10-11) ist jedoch aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität wahrscheinlicher
- **(17-19) *** [(-Lys¹⁶)-Leu¹⁷-Val¹⁸-Phe¹⁹-(Phe²⁰-)]

II - 3.2.3. Inkubation von humanem und murinem A β (4-15):

Auch Inkubationen von h- und mA β (4-15) mit aufgereinigter löslicher NEP wurden per HPLC aufgetrennt, die detektierten Peaks manuell aufgefangen und mittels MS analysiert. Die entstandenen Bruchstücke waren z. T. jedoch so klein, dass sie nicht vom Signalrauschen unterhalb von 500 Dalton zu unterscheiden waren. Dagegen konnten die erwarteten Fragmente (4-9) und (10-15) eindeutig detektiert werden (Nomenklatur entsprechend der vollständigen (1-42)-Sequenz).

II - 3.3. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopisch lassen das humane und das murine A β (1-42) ebenfalls ein unterschiedliches Verhalten erkennen: Abb. 9C und D zeigen das murine A β (1-42), bei dem in zwei unabhängigen Experimenten in keinem der betrachteten Quadranten eine Fibrillenbildung beobachtet werden konnte. Dagegen sind deutlich sphärische Partikel von fast einheitlicher Größe (ca. 25-40 nm) zu sehen. Beim humanen A β (1-42) dagegen konnte eine deutliche Fibrillenbildung gezeigt werden. In Abb. 9A

und B sind Fibrillen und Fibrillenbündel von mehr als 100 nm Dicke und mehreren Mikrometer Länge zu sehen. Auch dieses Experiment wurde wiederholt; Abb. 9 stellt eine repräsentative Auswahl dar.

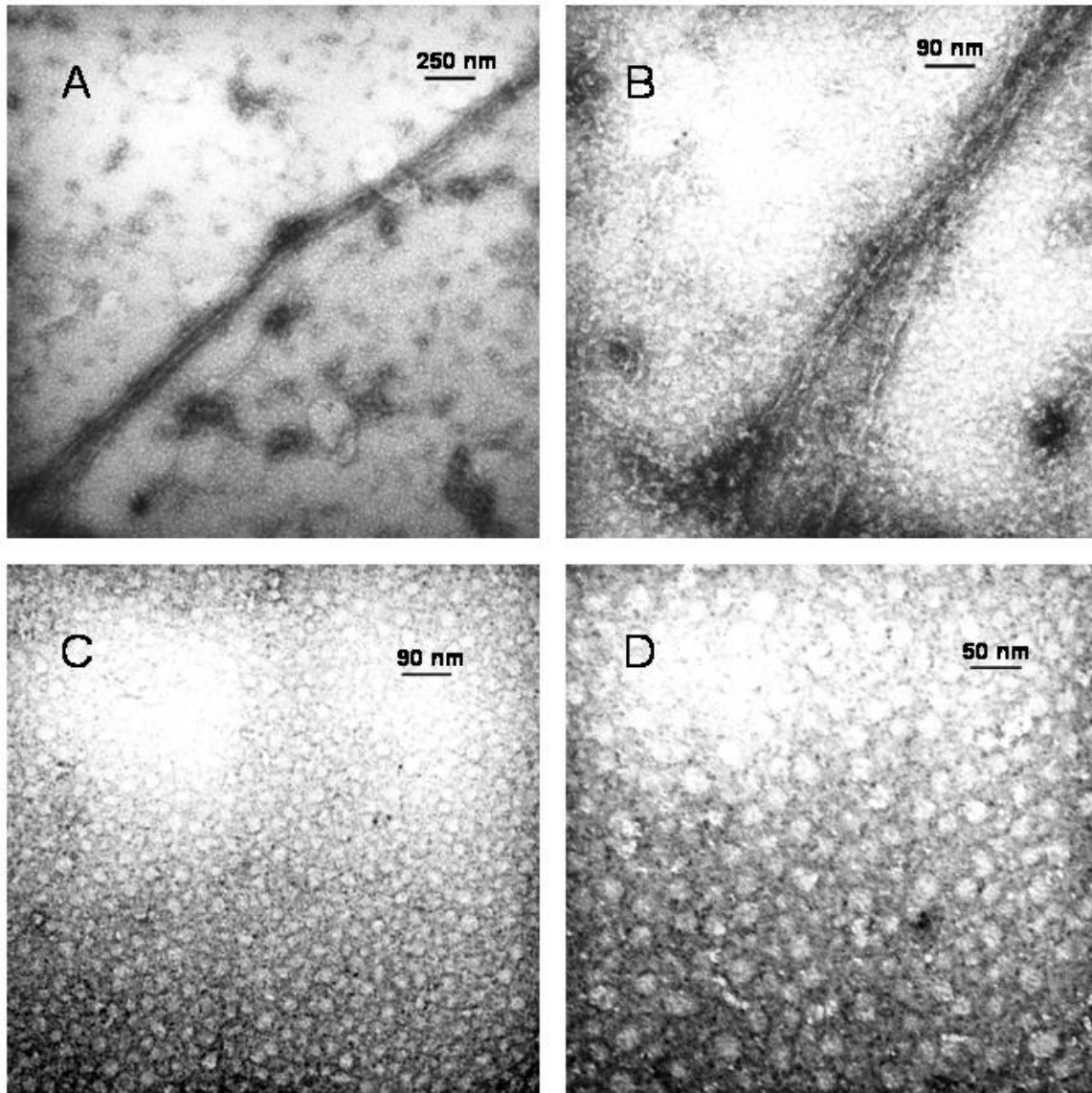


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von humanem (A und B) bzw. murinem Aβ (1-42) (C und D). Es wurden repräsentative Ausschnitte ausgewählt. Die Aufnahmen B und D stellen vergrößerte Ausschnitte aus A und C dar.

II - 4. DISKUSSION

Mutationen innerhalb der Sequenz des menschlichen A β -Peptids, z. B. die so genannten „Dutch“-, „Flemish“-, „Italian“- und „Arctic“-Mutationen, verursachen schwerwiegende „familiäre“ Formen der Alzheimerschen Erkrankung mit erhöhtem A β -Spiegel, erhöhter Fibrillen-, Protofibrillen- oder Plaquebildung und/oder erhöhter Neurotoxizität der A β -Peptide [Selkoe, 02b]. Ein wichtiger Schritt zur Beschreibung der Ursachen für das Krankheitsrisiko, das mit derartigen Mutationen verbunden ist, wurde mit einer Veröffentlichung von Tsubuki et al. gemacht [Tsubuki, 03]. Darin werden die unterschiedlichen Abbauraten der genannten Peptide und der A β -(1-40)-Wildform durch die NEP beschrieben. Die mutierten Varianten zeigten im Gegensatz zur Wildform eine höhere Resistenz gegenüber der hydrolytischen Aktivität der NEP, wurden jedoch durch Trypsin in einem vergleichbaren Maß gespalten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die mutierten Formen schlechter in die Bindungstasche der NEP passen und dass durch die resultierenden geringeren Abbauraten die Konzentration dieser besonders pathogenen Formen im Gehirn erhöht ist. Damit war ein enzymatischer Erklärungsansatz für die Pathogenität bestimmter A β -Formen gefunden. Mögliche „protektive“ Eigenschaften der bisher nur bei Mäusen und Ratten gefundenen murinen bzw. „rodent“ Form des A β -Peptids blieben weiterhin ungeklärt.

In den hier beschriebenen Abbauversuchen konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen erstmals gezeigt werden, dass murines A β (1-42) von der NEP signifikant schneller abgebaut wird als das analoge humane Peptid. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch die besser analysierbare Teilsequenz des murinen A β (4-15) bestätigt. Ob der beschriebene Unterschied entscheidend zum Fehlen von amyloidhaltigen Plaques in Gehirnen von Mäusen bzw. Ratten beiträgt, kann aus diesen Versuchen nicht endgültig abgeleitet werden. Der Befund stellt jedoch einen wichtigen Hinweis zur Beantwortung dieser Frage dar und unterstreicht die Bedeutung der bisher oft vernachlässigten katabolischen Seite des A β -Stoffwechsels. Es ist jedoch davon auszugehen, dass noch weitere Faktoren ursächlich an der fehlenden Alzheimer-Symptomatik bei Mäusen und Ratten beteiligt

sind, wie z. B. die Löslichkeit der Peptide, ihre Tendenz zur Aggregation, ihre zellschädigende Wirkung, oder die peptidolytische Wirkung anderer A β -abbauender Enzyme. Diese Diskrepanz zwischen Mensch und Maus/Ratte wird im Folgenden unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Ergebnisse sowie der genannten weiteren Faktoren diskutiert (zur Untersuchung des Spaltmusters innerhalb der Peptide durch MS siehe weiter unten).

II - 4.1. Erklärungsansätze für die fehlende Alzheimer-Symptomatik bei Mäusen und Ratten

Falls die hier beschriebenen Differenzen in den NEP-Abbaukinetiken von humanem bzw. murinem A β ausschlaggebend für die Unterschiede bei der Alzheimersymptomatik von Mensch bzw. Maus/Ratte sind, müssten NEP-Knockout-Tiere, da sie den Vorteil des schnelleren A β -Abbaus eingebüßt haben, in höherem Alter amyloidhaltige Plaques entwickeln. Derartige histologische Studien mit Hirnschnitten von NEP-Knockout-Mäusen wurden in Kooperation mit Partnern der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Dr. Schreff) und der Humboldt-Universität zu Berlin (Prof. Luneburg) mit monoklonalen Antikörpern gegen mA β (Prof. Multhaup, Freie Universität Berlin) durchgeführt. Es konnten jedoch auch bei sehr alten Tieren (>2 Jahre) keinerlei Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen gefunden werden (zu diesen Versuchen siehe auch weiter unten). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen inzwischen auch Iwata et al. [Iwata, 01]. Wenn diese Funde nun ausschließlich im Hinblick auf den katalytischen Einfluss der NEP betrachtet werden, ergibt sich zwangsläufig ein Widerspruch. Dieser Widerspruch könnte durch folgende Postulate oder Annahmen gelöst werden:

1. Die NEP ist nicht das geschwindigkeitsbestimmende Enzym beim A β -Abbau.

Die seit der Veröffentlichung von Iwata et al. im Jahr 2000 erschienenen Arbeiten sprechen in ihrer Gesamtheit jedoch eher für einen maßgeblichen Anteil der NEP am Gesamtabbau: Die Arbeitsgruppe um T. Saido am japanischen RIKEN Brain Science Institute konnte zeigen, dass im ZNS fast der gesamte Abbau des A β -Peptids Thiorphan- bzw. Phosphoramidon-sensitiv ist [Iwata, 00; Iwata, 01]. Außerdem wurde gefunden, dass die NEP unter den Thiorphan- bzw. Phosphoramidon-sensitiven Enzymen nahezu alleinverantwortlich für den A β -

Katabolismus ist [Shirotani, 01]. Der Einfluss weiterer Peptidasen darauf sollte aber auch nicht vernachlässigt werden. A β -katabolisierende Effekte wurden auch für ACE, IDE, ECE, Plasmin oder MMP-9 beschrieben, die zusammen genommen möglicherweise den Verlust der NEP teilweise kompensieren könnten. Es liegen bisher allerdings keine quantitativen Studien vor, die einen Vergleich der Bedeutungen von NEP, ECE und IDE für den A β -Abbau im ZNS gestatten würden. Die verfügbaren Daten sind jedoch für NEP und IDE besonders sicher und erstrecken sich auch auf überzeugende *In-vivo*-Untersuchungen. So gibt es bereits erste erfolgreiche Versuche, in hAPP-transgenen Mäusen (siehe Einleitung) die Plaque-Bildung durch Kreuzung mit anderen transgenen, NEP- oder IDE-überexprimierenden Mäusen hinauszuschieben oder sogar vollständig zu verhindern. Die Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Tiere ist gegenüber dem hAPP-Stamm stark erhöht [Leissring, 03]. In weiteren Versuchen wurde mittels Gentransfer die NEP-Aktivität im ZNS von hAPP-transgenen Tieren stark erhöht, wodurch sogar bereits bestehende Plaques wieder aufgelöst werden konnten [Marr, 03]. Es lässt sich zusammenfassen, dass die NEP für den A β -Abbau von wesentlicher Bedeutung ist. Die fehlenden Plaques in den NEP-Knockout-Mäusen lassen sich demzufolge nicht erklären. Eine Begründung dafür könnte das zweite Postulat darstellen:

2. In den NEP-defizienten Mäusen ist lediglich der Spiegel an **löslichem** A β erhöht.
Diese Vermutung wird durch die Arbeit von Iwata [Iwata, 01] sowie durch persönliche Korrespondenz mit einem der Autoren [Saido, 04] bestätigt, in der die A β -Konzentration (sowohl (1-40) als auch (1-42)) im ZNS der NEP-Knockout-Mäuse doppelt so hoch wie die der Kontrollen war. Dies führte uns zu der Überlegung, dass
3. murines A β (1-42) Eigenschaften besitzt, die eine Zusammenlagerung zu Plaques verhindern.

Dass das murine Peptid im Vergleich zu humanem A β unter den oben beschriebenen *In-vitro*-Bedingungen tatsächlich keine Fibrillen ausbildet, war in unseren Versuchen eindeutig nachweisbar, auch wenn frühere Publikationen dazu widersprüchlich waren: Hilbich et al. zeigten sowohl von humanem als auch vom entsprechenden „rodent“ (=Nager) A β (1-43) Fibrillenbildung unter dem Elektronenmikroskop, Kongorot-Anfärbung, Doppellichtbrechung unter

polarisiertem Licht sowie ein ähnliches Verhalten in Löslichkeitstests [Hilbich, 91]. Allerdings gibt es Anlass, die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Nager anzuzweifeln, denn in der Sequenz des dort benutzten „rodent“-Peptids fehlt der Austausch des *Arg*⁵ gegen *Gly*⁵. Die Unterschiede dieser beiden Aminosäuren hinsichtlich Ladung, Basizität, Hydrophilie/Lipophilie und Größe sind jedoch so bedeutend, dass die Ergebnisse dieser Arbeit als nicht repräsentativ für die Fibrillenbildung von murinem A β angesehen werden können. Weitere Aspekte der Methodik (Reinheit der Peptide, Bearbeitung der Peptide in 70%-iger Ameisensäure) bekräftigen diese Zweifel. Die extrem saure Behandlung kann eine Fibrillenbildung auch bei Peptiden induzieren, die im Neutralen diese Tendenz nicht zeigen [Fezoui, 00].

In einer Veröffentlichung von Fraser et al. wurden ebenfalls A β -Modifikationen des humanen und murinen Peptids untersucht, allerdings wurde hier nur mit den (1-40)-Sequenzen gearbeitet [Fraser, 92]. Diese sind zwar auch in der Lage, Fibrillen auszubilden, jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen und – wie inzwischen bekannt ist – über einen anderen Mechanismus als die (1-42)-Peptide [Bitan, 03b]. In der Arbeit von Fraser werden die Peptide z. T. auch unter extremen Bedingungen untersucht, z. B. in D₂O bei einem pD-Wert von 2,5. Im einzigen Teilversuch dieser Arbeit, bei dem beide Peptide unter gleichen Bedingungen untersucht wurden, konnte erst nach vorheriger Fixierung mit Glutaraldehyd-Dampf eine Fibrillenbildung beobachtet werden. Mit den (1-42)-Sequenzen konnten wir hingegen auch ohne diese Fixierung und ohne einen unphysiologisch niedrigen pH-Wert Fibrillen bei humanem A β beobachten.

Andere Experimente hingegen stützen unser Ergebnis zur Aggregation und Fibrillenbildung. So konnte gezeigt werden, dass die zwischen humanem und murinem A β unterschiedlichen Aminosäuren wesentliche Elemente der Fähigkeit zur Bindung von Zink- bzw. Kupferionen darstellen. *His*¹³ ist neben *His*¹⁴ für die Zinkbindung verantwortlich [Liu, 99; Yang, 00]. Für die Kupferbindung sind *Tyr*¹⁰ und *His*¹³ essentiell; *His*⁶ und wahrscheinlich auch die anderen Histidine können über die Komplexbildung eines Kupferions die Dimerisierung und Oligomerisierung von A β bewirken [Curtain, 01]. Weil Kupfer und Zink die Aggregation von A β wesentlich beschleunigen (bzw. dadurch die Aggregationskonzentration stark herab sinkt) und weil die für deren Bindung essentiellen Aminosäuren *Tyr*¹⁰ und

*His*¹³ im murinen A β gegen *Phe* bzw. *Arg* ausgetauscht sind, aggregiert humanes A β (1-40) in Gegenwart von Zink bzw. Kupfer folgerichtig schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen als die murine Variante [Atwood, 98; Bush, 94]. Von Otvos et al. wurde die Fähigkeit beider Peptide zur Fibrillenbildung ebenfalls untersucht. Sie fanden, dass humanes A β (1-42) bei neutralem pH-Wert sowie Peptidkonzentrationen und Versuchsbedingungen, die besser als die Arbeiten von Hilbich und Fraser die physiologischen Bedingungen widerspiegeln, reicher an β -Faltblattstrukturen ist als das murine Peptid [Otvos, Jr., 93]. Da die extrazellulären Plaques im menschlichen Alzheimer-Gehirn zum großen Teil aus β -Faltblatt-reichen Amyloidfibrillen gebildet werden, ist wahrscheinlich in dem geringeren Anteil an β -Faltblattstrukturen, in der dadurch beeinträchtigten Fibrillenbildung sowie in der stark veränderten Metallionenbindung die Ursache für die fehlende Plaquebildung bei Mäusen und Ratten zu sehen. Das würde erklären, warum trotz der erhöhten A β -Konzentration in den NEP-defizienten Mäusen keine Plaques zu beobachten sind.

Allerdings sind die Plaque-Herde wahrscheinlich nur eine von mehreren für die Alzheimer-Pathogenese bedeutsamen Formen des A β -Peptids. Seit ihrer Entdeckung durch Alois Alzheimer und vor allem seit ihrer eingehenden biochemischen und molekularbiologischen Erforschung in den 1980er und -90er Jahren wurden zwar die Plaque-Ablagerungen im Allgemeinen und die Amyloidfibrillen im Besonderen für die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung verantwortlich gemacht. In den letzten Jahren wurden allerdings zunehmend Hinweise dafür gefunden, dass auch die niedermolekulareren Aggregationsformen des A β -Peptids, wie z.B. die so genannten Oligomere oder Protofibrillen, neurotoxische/zellschädigende Eigenschaften besitzen [Walsh, 02; Bucciantini, 02]. Zudem zeigen lösliche Oligomere im Gegensatz zu Plaques eine signifikante Korrelation zu synaptischen Fehlfunktionen oder sogar zu frühen kognitiven Störungen (*cognitive impairment*). Es gibt inzwischen eine Anzahl von Arbeiten, die eine Korrelation von löslichen oder oligomeren Formen von A β mit der Schwere von Alzheimer-Symptomen beschreiben [Kuo, 96; Lue, 99; McLean, 99; Roher, 96]. Derartig eindeutige Beziehungen zwischen Plaque-Ablagerungen und Nervenschädigungen sind bisher nicht bekannt.

Wenn aber oligomeres A β in Hirnen von NEP-Knockout-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Tieren – wie oben beschrieben – erhöht ist und diese niedermolekularen A β -Aggregate zumindest für einen Teil der neurotoxischen Eigenschaften verantwortlich sind,

4. müssten die NEP-defizienten Tiere im Alter erhebliche Lernbeeinträchtigungen und andere Demenzsymptome zeigen.

Dazu wurden in Kooperation mit T. Walther (Erasmus Medical Center Rotterdam/NL) sowie G. Grecksch und A. Becker (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) Experimente zum Lernverhalten junger und sehr alter NEP (–/–)- und NEP (+/+)-Mäuse (9 bzw. 21 Monate) durchgeführt. Alle diese Versuche zeigten die gleiche, unerwartete Tendenz: Sowohl in der sogenannten „Shuttlebox“ als auch im „Morris-Watermaze-Test“ (zwei Tests zur Bestimmung der Lern- und Gedächtnisleistung) erwiesen sich die 21 Monate alten NEP-Knockout-Mäuse als lernfähiger als die gleichaltrigen Wildtypen. Diese Resultate wurden durch elektrophysiologische Experimente (*long-term potentiation*, LTP) an relevanten Hirnschnitten (Amygdala und Hippocampus) von 9 bzw. 24 Monate alten NEP (–/–)- und NEP (+/+)-Tieren bestätigt [Walther, 05]. Diese Resultate stehen in einem völligen Widerspruch zu den Erwartungen, wonach das Fehlen der NEP zu einem verlangsamten Abbau der A β -Peptide und somit zur Akkumulation der Alzheimer-Peptide im ZNS (mit all ihren neurotoxischen Folgen) beitragen sollte. Viel versprechende Versuche an NEP-Knockout-Mäusen mit einem anderen Peptid, welches durch die NEP hydrolysiert wird – dem neuroprotektiven und die Lern- und Gedächtnisleistung fördernden Glucagon-Like Peptid 1 (GLP-1 [Perry, 04; During, 03]), werden zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe am FMP durchgeführt.

Auch wenn diese Experimente eine völlig neue Perspektive in der Erforschung von Gedächtnis und Lernfähigkeit eröffnen, kann damit noch weniger erklärt werden, warum Mäuse mit deutlich erhöhtem A β -Spiegel (die NEP-Knockout-Mäuse) keine Alzheimer-Symptomatik zeigen. Wenn die Amyloid-Hypothese nicht in Frage gestellt werden soll, muss es eine andere Lösung dafür geben. Eine weitere Überlegung geht deshalb von einer

5. Speziesabhängigkeit der zellschädigenden Eigenschaften der Amyloid-Peptide aus.

Es ist denkbar, dass murines A β eine geringere Neurotoxizität als das humane Analogon hat. Diese Vermutung wird durch mehrere Publikationen unterstützt. So besitzt murines A β (1-40) im Unterschied zur humanen Variante stark herabgesetzte hydrolytische und oxidative Eigenschaften [Brzyska, 01]. Die Generierung von zellschädigendem H₂O₂ in Gegenwart von Kupfer ist bei humanem A β (1-42) im Gegensatz zum murinen Peptid stark erhöht [Opazo, 02]. Folgerichtig fanden Huang et al. in Gegenwart von Kupfer eine starke Erhöhung der Neurotoxizität in der Reihenfolge mA β (1-40) << hA β (1-40) < hA β (1-42) [Huang, 99], was die oben aufgestellte Hypothese bestätigt.

Vermutlich tragen also mehrere Faktoren dazu bei, dass Mäuse und Ratten keine voll ausgeprägte Alzheimer-Symptomatik entwickeln:

Erstens zeigen diese Tiere – wie hier erstmals beschrieben – im Vergleich mit dem Menschen eine beschleunigte Clearance des A β -Peptids durch die NEP. Ähnliches könnte auch für das IDE gelten, denn die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von humanem und murinem A β betreffen auch eine für dieses Enzym typische Spaltsstelle (*His*¹³–*His*¹⁴ im humanen Peptid bzw. *Arg*¹³–*His*¹⁴ im murinen Peptid).

Zweitens besitzt murines A β im Vergleich zum A β -Peptid des Menschen eine stark herabgesetzte Neurotoxizität, und auch biochemische und chemisch-physikalische Eigenschaften wie die Metallionen-Komplexierung sind im murinen Peptid deutlich verändert.

Drittens konnte hier eine verminderte oder gar nicht vorhandene Fähigkeit des murinen A β -Peptids zur Fibrillen- und damit Plaquebildung demonstriert werden.

Diese Erkenntnisse können zusammen genommen als ein weiterer Hinweis auf die Richtigkeit der Amyloid-Hypothese gewertet werden. Da sich die von uns und anderen Arbeitsgruppen gefundenen biochemischen und zellphysiologischen Eigenschaften des humanen bzw. murinen A β mit der Schwere der Alzheimer-Symptomatik von Mensch bzw. Maus/Ratte decken, scheint das humane A β tatsächlich einen pathogenen Einfluss auf die Erkrankung zu haben. Zusätzlich können aus den hier beschriebenen Ergebnissen wichtige Hinweise auf bestimmte

Aminosäuren abgeleitet werden, die zur Pathogenität des humanen A β -Peptids beitragen bzw. diese in der murinen Form verhindern. Die verantwortliche Sequenz für die Fibrillenbildung und für die Neurotoxizität des humanen A β wird allgemein C-terminal von *His*¹⁴ gesehen. Dieser Abschnitt ist jedoch bei humanem und murinem A β identisch. Es kann also vermutet werden, dass murines A β in den ersten 14 Aminosäuren Eigenschaften aufweist, die die Pathogenität der gemeinsamen Sequenz abschwächen. Das für die Metallkomplexierung wichtige *His*¹³ ist wahrscheinlich der entscheidende Faktor für die Fähigkeit des humanen Peptids zur Bildung von Amyloidfibrillen. Die für die Neurotoxizität wichtigste der drei ausgetauschten Aminosäuren kann dagegen nur anhand von A β -Analogen untersucht werden, bei denen die drei Aminosäuren einzeln ausgetauscht werden. Für den schnelleren Abbau des murinen Peptids ist nach unserer Studie *Phe*¹⁰ verantwortlich.

II - 4.2. Hydrolytische Angriffsstellen der NEP innerhalb von A β

Neben den Abbauversuchen und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde in dieser Arbeit auch die Lage der enzymatischen Angriffsstellen für die NEP innerhalb der A β -Moleküle untersucht und mit Angaben aus älteren Publikationen verglichen. Diese Kenntnisse gehen – trotz zahlreicher Zitate in der Literatur – sämtlich auf eine Publikation aus dem Jahr 1995 zurück [Howell, 95]. Die dort beschriebenen Abbauversuche wurden mit aufgereinigter löslicher NEP an humanem A β (1-40) durchgeführt. Unsere Untersuchungen hatten zum Ziel, diese Ergebnisse unter Verwendung von rekombinanter NEP und A β (1-42) zu überprüfen, aber auch eventuelle Unterschiede im Spaltungsmuster zwischen humanem und murinem A β aufzuzeigen. Zuvor wurde auch das Spaltmuster der (4-15)-Teilsequenzen untersucht, um die Eignung dieses Modells für den Abbau durch die NEP anhand eines Vergleichs der Spaltstellen zu belegen. Der massenspektroskopische Nachweis der erwarteten Fragmente (1-6) und (7-12) (entsprechend den Bruchstücken (4-9) und (10-15) in der Nomenklatur der vollständigen (1-42)-Sequenz) bestätigte diese Hypothese. Weitere Informationen konnten aus den MS-Signalen der (4-15)-Inkubation nicht gezogen werden, da die entstanden

Bruchstücke zu klein waren, um mit der MALDI-TOF-Technologie detektiert zu werden.

Anschließend konnten in unseren Untersuchungen mit der vollständigen Sequenz A β (1-42) die drei in der Arbeit von Howell et al. gefundenen Bruchstücke (4-9), (20-30) und wahrscheinlich auch (31-33) bestätigt werden. Die Fragmente (20-30) und (31-33) waren jedoch nicht so dominierend wie bei den Studien von Howell. Die größten Peaks konnten bei uns dagegen bei beiden Spezies den Bruchstücken (10-17) sowie einem Signal zugeordnet werden, das wahrscheinlich dem Fragment (12-17) entspricht. Neben dem Fragment (4-9) sind wahrscheinlich auch die Di- bzw. Tetrapeptide (18-19) bzw. (39-42) in höherer Ausbeute entstanden. Bei den genannten Hauptpeaks gab es keine nennenswerten Speziesunterschiede – lediglich das Bruchstück (10-16) (begleitet von dessen C-terminalen Abbauprodukten) wurde nur beim murinen A β in hoher Ausbeute gefunden. Dieses könnte aus der Vorstufe (10-17), aber auch durch direkte Spaltung der *Lys-Leu*-Bindung entstanden sein. Die Bruchstücke (31-33) und (31-32) waren dagegen aus der Inkubation des murinen Peptids in deutlich geringerer Ausbeute hervorgegangen als beim humanen A β . Bei beiden A β -Peptiden kann aus unseren Ergebnissen und denen von Howell et al. keine alleinige initiale Spaltstelle abgeleitet werden. Die hauptsächlichen katalytischen Angriffspunkte können allerdings mit großer Sicherheit in den Peptidbindungen von *Glu*³-*Phe*⁴, *Gly*⁹-*Tyr*¹⁰ (bzw. *Gly*⁹-*Phe*¹⁰ beim murinen Peptid) *Glu*¹¹-*Val*¹², *Lys*¹⁶-*Leu*¹⁷ (nur beim murinen Peptid), *Leu*¹⁷-*Val*¹⁸, *Phe*¹⁹-*Phe*²⁰, *Ala*³⁰-*Ile*³¹, *Gly*³³-*Leu*³⁴ (die beiden letzten Bindungen vorwiegend beim humanen Peptid) sowie *Gly*³⁸-*Val*³⁹ gesehen werden.

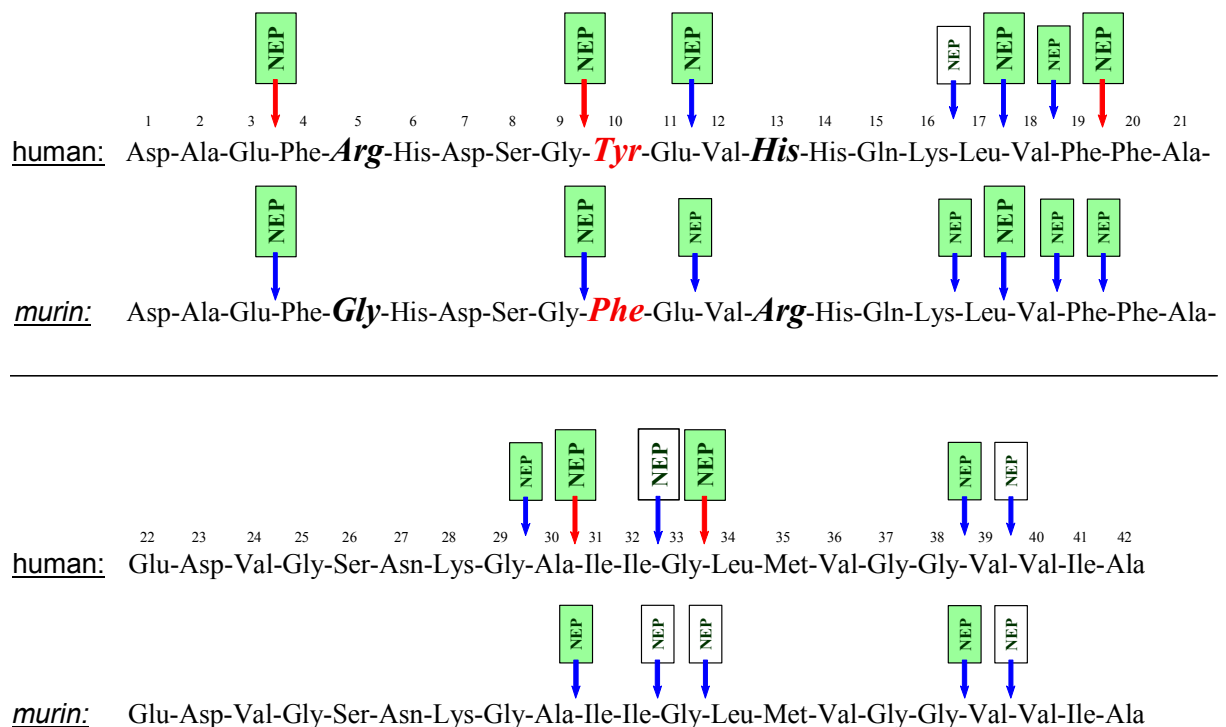


Abb. 10: Ergebnisse aus [Howell, 95] im Vergleich mit den hier beschriebenen Resultaten (in Analogie zur Abb. 7).

Die Größe der Pfeile/Kästchen spiegelt grob die Signalgröße der in unseren Experimenten gefundenen Bruchstücke wider. Rote Pfeile markieren Spaltstellen aus der Arbeit von Howell, welche sämtlich auch bei uns auftraten. Spaltstellen mit blauen Pfeilen wurden von uns erstmals beschrieben. Weiße Kästchen kennzeichnen Spaltstellen aus MS-Signalen, deren Echtheit nicht völlig gesichert war (siehe auch Kommentare in den Ergebnissen).

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen zu den unterschiedlichen Abbauraten von murinem und humanem Aβ durch die NEP, zur fehlenden Fibrillenbildung des murinen Peptids sowie zum Spaltmuster beider Peptide durch die NEP lässt sich zwar noch keine unmittelbare therapeutische oder diagnostische Verwertbarkeit ableiten. Die neuen Erkenntnisse – besonders zum Einfluss der Aβ-Aminosäuresequenz auf dessen Katabolismus und die Fibrillenbildung – haben jedoch generelle Bedeutung für das Verständnis der Pathogenität von Aβ und der Entwicklung der Alzheimerschen Erkrankung.

III. NEP UND ALKOHOLKONSUM

III - 1. EINLEITUNG

In fast allen Industrieländern stellen Missbrauch und Abhängigkeit von Ethanol ein großes gesundheitliches, soziales und ökonomisches Problem dar. Schätzungen zufolge sind in diesen Staaten bis zu 8% der Männer und etwa 3% der Frauen durch die Alkoholkrankheit gefährdet. In Deutschland sind etwa 1,7 Mio. Menschen alkoholabhängig, mindestens weitere 2,4 Mio. sind durch Missbrauch gefährdet, und geschätzte 6 bis 9 Mio. Bundesbürger zeigen einen so genannten „riskanten Konsum“. Die Dunkelziffer wird jedoch in diesen Fällen auf ein Vielfaches geschätzt. Jährlich sind in Deutschland ca. 800.000 Todesfälle zu beklagen, die direkt oder indirekt mit der Wirkung von Alkohol in Zusammenhang stehen. Die volkswirtschaftlichen Kosten werden hierzulande auf etwa 20 bis 50 Mrd. € geschätzt [Bundesministerium für Gesundheit und Soziale Sicherung, 00].

In den USA sind mehr als 20% der stationären Aufenthalte direkt oder indirekt durch Alkoholkonsum bedingt. Die jährlichen Kosten des Alkoholismus, sowohl durch medizinische als auch durch sozioökonomische Probleme verursacht, werden in den Vereinigten Staaten auf mehr als 100 Mrd. \$ geschätzt [Messing, 01].

Damit ist aber nur ein Teil der Problematik umrissen, denn die meisten Betroffenen werden über einen langen Zeitraum hinweg – im Durchschnitt sind es fünfzehn Jahre – nicht behandelt. Für Angehörige und Hausärzte stellt es ein großes Problem dar, erst die Anzeichen der Sucht zu erkennen, dann den Betroffenen darauf anzusprechen und ihn schließlich so weit zu motivieren, dass er eine geeignete Therapie beginnt. Für einen Alkoholabhängigen selbst ist dieser erste Schritt noch wesentlich schwieriger. So ist es zu erklären, dass sich nur 7% der Alkoholkranken an spezielle Einrichtungen der Suchthilfe wenden; nur rund 5% unterziehen sich einer Entzugsbehandlung.

Um diesen therapiewilligen Patienten adäquat helfen zu können, bedarf es nicht nur eines Entzugs, sondern vor allem psychotherapeutischer Behandlung oder der

Mitarbeit in einer Selbsthilfegruppe sowie der Unterstützung durch sein soziales Umfeld. Ohne diese zusätzlichen Maßnahmen werden mehr als 90% der Alkoholkranken nach einer bloßen Entzugsbehandlung rückfällig. Da aber die jahre-, oft jahrzehntelange Intoxikation mit Ethanol zu extremen Veränderungen im Gehirn führt (Verschiebungen im Neurotransmitter-Gleichgewicht; Veränderungen in der Gentranskription, RNA- und Protein-Prozessierung sowie der synaptischen Struktur) [Nestler, 01], ist es in den meisten Fällen notwendig, die Entwöhnung medikamentös zu unterstützen.

Über die neurobiologischen, neuroanatomischen und molekularen Grundlagen der Abhängigkeit wurden besonders in den 1990er Jahren, dem „Jahrzehnt des Gehirns“, umfangreiche neue Erkenntnisse gewonnen. Auf deren Basis erfolgte die Entwicklung von Wirkstoffen, die gegen das für die meisten Rückfälle verantwortliche „Craving“ wirken. Craving ist das anfallsartig auftretende, heftige und unkontrollierbare Verlangen nach Alkohol, das einen abstinenten („trockenen“) Alkoholiker noch viele Jahre nach einem erfolgreichen Entzug in einen Rückfall treiben kann. Die heute gebräuchlichsten Anti-Cravingmittel Naltrexon und Acamprosat sprechen jedoch nur bei etwa 1/5 bis maximal 1/3 der Patienten an. Warum es einen so hohen Prozentsatz an Non-Respondern gibt, ist bisher unklar.

Die molekularen Zusammenhänge der Abhängigkeit von Substanzen im Allgemeinen und der Alkoholsucht im Besonderen werfen allerdings noch immer ungelöste Fragen auf. Die Ursache dafür ist im komplizierten Ineinandergreifen der verschiedenen physiologischen Regelkreise des ZNS zu sehen. Im Fall der Alkoholkrankheit kommt allerdings hinzu, dass für Ethanol per se kein Rezeptor bekannt ist, auch wenn in letzter Zeit Rezeptoren nachgewiesen wurden, die in die Vermittlung der Ethanolwirkungen einbezogen sind. So wurde eine Mutation in der α_1 -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors gefunden, der bei transgenen Mäusen mit dieser Mutation die Sensitivität gegenüber Alkohol stark herabsetzte, aber die Sensitivität gegenüber anderen Narkotika unbeeinflusst ließ [Findlay, 02; Wick, 98].

Viele Teile des Puzzles der Alkoholabhängigkeit oder allgemein von Suchterscheinungen/-erkrankungen sind heute bereits bekannt. Die meisten der daraus abgeleiteten potentiellen pharmakologischen Targets stellen Neurotransmitter im weiteren Sinne dar (z. B. Opioide, Dopamin, Serotonin, Glutamat, GABA, NPY, CRH) bzw. deren jeweilige Rezeptoren. Bisher nur wenig Aufmerksamkeit galt

hingegen den Enzymen, welche am Anabolismus/Katabolismus dieser Neurotransmitter beteiligt sind. Dabei spielten die Tyrosin-Hydroxylase und die Alkohol-Dehydrogenase eine hervorgehobene Rolle. In den letzten Jahren wurden allerdings auch zunehmend Arbeiten veröffentlicht, die die Funktion von peptidabbauenden Enzymen in der Pathogenese der Sucht bzw. der Alkohol-Abhängigkeit untersuchen. Das ist umso bedeutender, als inzwischen eine zunehmend größere Zahl peptidischer Neurotransmitter sowie deren Bedeutung für die Drogenabhängigkeit bekannt geworden sind. Die Zahl der Neuropeptide übersteigt die der Neuropeptidasen deutlich, da die meisten Peptidasen in der Regel ein größeres Spektrum von Neuropeptiden abbauen. Es ergeben sich daher durch die Hemmung oder Induktion von Neuropeptidasen zwar weniger selektive, dafür in ihrer Wirkungsweise aber umso effektivere Therapieansätze.

Solche Zusammenhänge zwischen Peptidase-Aktivität und Alkoholkonsum wurden bisher u. a. für das ACE, die APN und die NEP beschrieben. Die Hemmung des ACE führte in den meisten Experimenten zu einer Reduktion des Alkoholkonsums [Robertson, 94; Grupp, 92a; Grupp, 92b], was durch die Publikation von Maul et al. (incl. der Klärung der den Alkoholkonsum fördernden Rolle von Angiotensin I) eindeutig bestätigt werden konnte [Maul, 01]. Die Hemmung der APN durch Bestatin führte ebenfalls zu einer Reduktion des Alkoholkonsums [Szczepanska, 96; Szczepanska, 93].

Die bisher publizierten Daten zur Bedeutung der NEP bei der Alkoholsucht waren dagegen widersprüchlich. Einerseits wurde nach Gabe von so genannten „NEP-Inhibitoren“ eine Reduktion des Alkoholkonsums berichtet. Diese Befunde sind aber anzuzweifeln, weil es sich bei diesen Substanzen entweder mit Kelatorphan um einen kombinierten NEP- und APN-Inhibitor handelte [George, 91] oder mit „SAAVE“ um eine Mischung aus Aminosäuren und Vitaminen, für die zwar eine Wirkung auf den Alkoholkonsum beschrieben wurde [Blum, 88], die aber kaum auf eine selektive Hemmung der NEP zurückgeführt werden kann. Aus diesem Grund wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und NEP-Aktivität durchgeführt. So konnten in verschiedenen Hirnregionen (besonders Tegmentum/Colliculi) von Alkohol-präferierenden Ratten (AA) im Vergleich zu Alkohol-meidenden Ratten (ANA) signifikant erhöhte NEP-mRNA-Spiegel und NEP-Aktivitäten detektiert werden [Winkler, 98]. Diese Befunde

werden durch andere Publikationen [Panchenko, 84; Beliaev, 83b; Frette, 98] sowie durch weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe bestätigt.

Mit NEP-defizienten Mäusen stand unserer Arbeitsgruppe ab Mitte der 1990er Jahre erstmals ein Modell zur Verfügung, in dem die NEP im gesamten Körper spezifisch ausgeschaltet ist, ohne dass invasive Techniken erforderlich sind. Durch Verwendung dieser Tiere schien es grundlegend geklärt, dass das Fehlen der NEP zu einem erhöhten Alkohol-Konsum führt [Siems, 00]. In diesen Versuchen von Siems et al. wurden jeweils fünf männliche Mäuse in einem Makrolonkäfig Typ III gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu zwei gleich aussehenden Flaschen mit Wasser bzw. alkoholischer Lösung, deren Position regelmäßig gewechselt wurde. Durch dieses Versuchsdesign konnten sowohl invasive Techniken als auch Platzpräferenzen oder ein limitierter Zugang zu Alkohol vermieden werden. Vor allem aber wurden hier erstmals die Untersuchungen zur Funktion der NEP bei vollständigem Verlust der Enzymaktivität durchgeführt, was zuvor nicht ohne schwere invasive Eingriffe (besonders im ZNS) möglich war.

III - 1.1. Aufgabenstellung

Für die eigenen weitergehenden Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des Zusammenhangs NEP – Alkoholkonsum sollte zunächst das bei Siems et al. beschriebene Versuchsmodell reetabliert werden. Geringfügige Modifikationen waren darauf ausgerichtet, den störenden Einfluss diverser Stressoren zu minimieren. Dazu wurden die Tiere ausschließlich in Gruppen von zwei Mäusen gehalten, jedoch getrennt durch eine mit Löchern versehene Plexiglaswand. Durch diese Versuchsanordnung wurden einerseits soziale Kontakte ermöglicht, andererseits wurde das Austragen von Rangkämpfen verhindert. Die Versuche wurden zudem in einer möglichst stressarmen Umgebung durchgeführt, d. h. in einem Tierlabor mit geringer Gesamtzahl und daraus resultierendem seltenen Betreten durch das Pflegepersonal sowie unter Zugabe von Zellstoff für den Nestbautrieb.

In ersten orientierenden Versuchen während der Etablierungsphase konnten nach diesem Schema nicht die bei Siems et al. beobachteten Unterschiede im Alkoholkonsum (NEP(-/-) > NEP(+/+)) reproduziert werden. Lediglich bei Versuchsbeginn und bei nachweisbaren störenden Einflüssen von außen wurde ein

kurzzeitiger Anstieg beim Alkoholverbrauch der Knockout-Tiere beobachtet, der jedoch nie über mehrere Sessions anhielt. Dies ließ uns vermuten, dass diese widersprüchlichen Ergebnisse nicht allein durch den Genotyp beeinflusst werden, sondern dass die von Siems et al. ermittelten Differenzen zwischen den Genotypen erst durch einen nicht mehr genau zu definierenden Stressor ausgelöst wurden. Diese unerwarteten Beobachtungen veranlassten uns, die Suche nach den möglichen Ursachen eines erhöhten Alkoholkonsums bei den NEP-Knockout-Tieren mit Hilfe eines definierten Stress-Paradigmas fortzusetzen. Zur Klärung des Einflusses von stressenden Faktoren wurde folgende Strategie gewählt:

Die Mäuse wurden zunächst in einer stressarmen Eingewöhnungsphase an den freien Zugang zu einer Alkohollösung und Wasser gewöhnt. In der nächsten Phase wurden alle Tiere einem kurzzeitigen definierten Stress ausgesetzt und anschließend wurde unter erneut stressarmen Bedingungen die Auswirkung auf den Alkoholkonsum verfolgt. Um auszuschließen, dass die gemessenen Differenzen im Alkoholkonsum durch Unterschiede in der Alkoholabbau-Kinetik oder durch unterschiedliche Präferenzen (z. B. Platzpräferenzen, kalorische Präferenzen, Präferenzen bezüglich süßen oder bitteren Geschmacks) verursacht waren, wurden zuvor diese Parameter überprüft. Die Untersuchungen wurden durch Experimente zum Enkephalinabbau und zur pharmakologischen Inhibierung der NEP bei wildtypischen Mäusen ergänzt.

III - 2. METHODEN

III - 2.1. Tierhaltung

NEP-defiziente Tiere wurden – wie bei Lu et al. beschrieben [Lu, 95] – auf dem Hintergrund C57Bl/6J gezüchtet. 24 männliche NEP-Knockout-Mäuse (homozygot, im Folgenden auch mit NEP (–/–) bezeichnet) und 16 wildtypische C57Bl/6J-Mäuse (im Folgenden auch mit NEP (+/+) bezeichnet) wurden in Barrierehaltung in einem 12h-Licht-Dunkel-Zyklus bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$ in Makrolonkäfigen Typ III (43 x 27 x 16 cm) gehalten, welche Weichholzfaser und Zellstoff als Einstreu enthielten. Alle zwei Wochen wurden die Tiere gewogen. In jedem Käfig befanden sich, getrennt durch eine Plexiglaswand, zwei Tiere des jeweils gleichen Genotyps. Diese Wand enthielt

9 Bohrungen mit einem Durchmesser von je 12 mm und trennte den Käfig der Länge nach.

III - 2.2. Trinkversuche

III - 2.2.1. Allgemein

Jedes Tier hatte freien Zugang zu zwei Trinkflaschen, die entweder Leitungswasser oder ein Ethanol–Wasser-Gemisch mit den im Text angegebenen Konzentrationen (V/V) enthielten. Als Trinkflaschen wurden Kunststoffflaschen mit Doppelkugelventilen (Cascade 5, HAGEN Deutschland GmbH & Co. KG, Ragun/Deutschland) verwendet. Diese Flaschen wurden in Vorversuchen als besonders geeignet hinsichtlich der Tropfeigenschaften und Dichtigkeit befunden. Die Flüssigkeiten (Alkohollösung bzw. Wasser) konnten zusätzlich chemisch definierte Substanzen – wie unter den Ergebnissen beschrieben – enthalten. Zunächst waren die Mäuse Alkohol-naiv, dann wurden ihnen steigende Ethanol-Konzentrationen angeboten, um die für den anschließenden Test am besten geeignete Konzentration zu bestimmen. Um eventuelle Seitenpräferenzen der Tiere (zur linken oder rechten Flasche) auszugleichen, wurden die Positionen der Flaschen regelmäßig vertauscht. Die Ergebnisse werden entweder als konsumierte Alkoholmenge [g reines Ethanol/kg Körpergewicht/Tag] oder als Alkoholpräferenzratio (Anteil der konsumierten Alkohollösung an der Gesamttrinkmenge, als Bruchteil von 1) angegeben. Das Vorgehen bei den diversen Präferenztests wird unter „Ergebnisse“ detailliert beschrieben.

III - 2.2.2. Trinkverhalten unter NEP-Inhibierung durch Candexatril

Der NEP-Inhibitor Candexatril (Pfizer, Karlsruhe/Deutschland) wurde mit dem täglichen Futter gegeben. Der durchschnittliche tägliche Futtermittelverbrauch der Mäuse wurde vorher mit ca. 80 g/kg Körpergewicht/Tag bestimmt. Die Substanz wurde wie folgt in das Futter eingearbeitet: Pelletiertes Standardfutter (Altromin Standard-Diät Ratten – Mäuse 1324) wurde zu Partikeln < 1,4 mm zerkleinert und Candexatril in der entsprechenden Dosierung gleichmäßig darin eingearbeitet. Die Mischung wurde mit einer Gelatinealkohol-Lösung (1,0 g Gelatine, 9,2 g Ethanol 90%, 0,6 g

HCl 1M, 9,2 g Wasser) befeuchtet und anschließend granuliert. Das Granulat wurde durch ein Röhrchen gepresst, so dass Pellets mit ca. 1 cm Durchmesser und 2,5 cm Länge entstanden. Die Pellets wurden über Nacht in einem Trockenschrank bei 45°C getrocknet.

III - 2.2.3. Trinkverhalten unter Einwirkung von sozialem Stress

In einem ersten Versuch wurden jeweils zwei männliche Wurfgeschwister für mehrere Wochen durch eine Plexiglaswand separiert in einem Käfig gehalten. Nach einer Zeit der Gewöhnung an den Zugang zu Alkohol, sichtbar an stabilem Alkoholverbrauch, wurden die Trennwände entfernt, woraufhin es zu Rankämpfen zwischen den beiden Tieren kam. Bei der statistischen Auswertung halbiert sich nach Entfernen der Trennwände die Anzahl der erfassten Werte, weil dadurch für jeweils zwei Tiere eine Wasser- und eine Alkoholflasche zur Verfügung standen.

In einem weiteren Versuch wurde sozialer Stress als modifizierter Intruder-Test nach Sillaber [Sillaber, 02] ausgeübt. Dafür wurde jede der NEP-Knockout- oder Wildtyp-Mäuse einzeln in einen ihnen fremden Käfig (Abmessungen s. oben) zu drei ihnen unbekannten männlichen Mäusen (Residente) gesetzt. Die gleichaltrigen Residenten (C57Bl/6J) wurden in diesem Käfig bereits 7 Tage vor dem Test gehalten. Die Residenten griffen den Intruder innerhalb einer Minute an. Sofort nach der ersten Attacke wurden die Residenten und der Intruder durch eine Plexiglaswand (siehe oben) getrennt, sodass sich der Intruder für 15 min im kleineren Teil des Käfigs (Verhältnis der Grundflächen ca. 5:1) befand. Danach wurde er zurück in seinen Heimkäfig gesetzt, wo er freien Zugang zu Wasser und Alkohol hatte.

III - 2.3. Enzym- und Blut-Analytik

Für die Enzym- und Blut-Analytik wurden die Mäuse durch CO₂ betäubt, dann sofort dekapitiert und das Blut aufgefangen. Nach ca. 20 min Koagulation wurde das Serum durch Zentrifugation (5 min bei 2000 g) separiert, abgetrennt und bei -80°C eingefroren. Ausgewählte Hirnregionen wurden nach Popov [Popov, 73] präpariert und daraus Membran-Präparationen wie bei Hulme beschrieben [Hulme, 92] hergestellt. Für die folgenden Analysen wurden die Proben nach dem Auftauen durch

Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschallgerät (Sonotrode UW 60 mit Generator HD 60, Fa. Bandelin, Berlin/Deutschland) bei 4°C resuspendiert und homogenisiert.

Der Proteingehalt der Präparationen wurde mit Hilfe einer nach Bradford [Bradford, 76] modifizierten Methode bestimmt. Kurz gefasst wurden 20 µl proteinhaltige Lösung mit 1 ml Roti-Quant-Lösung (Roth, Karlsruhe/Deutschland) (1:5 mit Wasser verdünnt) in Halbmikroküvetten Plastibrand 1,5 ml (Brand GmbH & Co KG, Wertheim/Deutschland) vermischt und die Absorption der Lösung im linearen Bereich bei 595 nm in einem UV-Vis-Spektrophotometer UV mini 1240 (Shimadzu, Kyoto/Japan) vermessen.

Die NEP-Aktivität wurde mit einer von Winkler et al. entwickelten Methode gemessen [Winkler, 98]: 100 µl einer 200 µM [D -Ala²,Leu⁵]enkephalin-Lösung (DALEK) wurden in Gegenwart von 50 µl einer Lösung von Bestatin und Lisinopril (100 µM bzw. 1 µM Endkonzentration) mit 50 µl der oben beschriebenen Membran-Präparation oder Serum inkubiert, die Reaktion mit 100 µl HClO₄ 0,35 M gestoppt und das resultierende Abbauprodukt Tyr-D-Ala-Gly mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) über eine RP-C18-Säule mit 6% Acetonitril in saurem Phosphat-/Perchloratpuffer getrennt und bei 216 nm detektiert. Die Spezifität der Reaktion wurde durch den NEP-Inhibitor Candoxatrilat in der Endkonzentration 10 µM (Pfizer, Karlsruhe/Deutschland) bestätigt. Die Substrate und übrigen Inhibitoren wurden von der Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland, bezogen.

Die ACE-Aktivität wurde mit einer fluorimetrischen Methode, modifiziert nach Friedland und Silverstein, gemessen [Friedland, 76]. Dazu wurden 10 µl biologisches Material mit 20 µl Hip-His-Leu 25 mM als Substrat in Gegenwart von 10 µl Bestatin 2,5 µM und 210 µl phosphathaltigem Puffer (0,5 M K₂HPO₄, 1,5 M NaCl, pH-Wert 8,3; diese Lösung vor Gebrauch 1:4,6 mit H₂O verdünnt) inkubiert. Das dabei entstehende His-Leu wurde mit 1 ml NaOH 0,506 M und 100 µl o-Phthalaldehyd (20 mg/ml Methanol) versetzt und der entstehende Komplex nach 10minütigem Stehen im Dunkeln mit 300 µl HCl 2 M versetzt. Dieser Komplex wurde im Fluorimeter Luminescence Spectrometer LS 50 B (Perkin-Elmer Ltd., Beaconsfield/England) bei 365 nm Anregungs- und 500 nm Emissionswellenlänge detektiert. Die Spezifität der Reaktion wurde durch den ACE-Inhibitor Lisinopril in der

Endkonzentration 1 μ M bestätigt. Substrate und Inhibitoren wurden von der Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufenkirchen/Deutschland, bezogen.

III - 2.4. Enkephalinabbau

Die Hydrolyse von Leu-Enkephalin durch Membranpräparationen verschiedener Hirnregionen von NEP-Knockout-Mäusen wurde mit derjenigen von wildtypischen Mäusen verglichen. Für jede Region wurden je drei Ansätze mit bzw. ohne den Inhibitor der Aminopeptidase N (APN), Bestatin, inkubiert. Die ungehemmten Ansätze wurden nach 30, 60 und 90 min analysiert, die Bestatin-gehemmten nach 60, 90 und 120 min.

III - 2.5. Alkoholabbau-Kinetik nach intraperitonealer Verabreichung

2 bzw. 3 h nach intraperitonealer Verabreichung eines Alkoholbolus (3,5 g Ethanol/kg Körpergewicht) wurden je 10 μ l Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Alkoholkonzentration im Blut wurde nach der Methode von Roach und Creaven [Roach, 68] in einem transportablen Gaschromatographen (Perkin Elmer 8600) analysiert.

III - 2.6. Statistik

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe der Programme GraphPad InStat 3.00 für Windows 95, GraphPad Prism 3.00 für Windows 95 (beide von GraphPad Software, San Diego, USA) und SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago/USA) berechnet. Der verwendete Test und die statistischen Parameter werden in den Ergebnissen beschrieben. Sofern nichts anderes angegeben ist, wird die Abweichung vom Mittelwert in Text und Abbildungen als SEM (*standard error of mean* = Standardfehler des Mittelwerts) angegeben und wurden die t-Tests zweiseitig und ungepaart durchgeführt. Bei nichtparametrischen Tests wird nur der Median als Lageparameter angegeben. In Abbildungen wird bei Mono-, Zwei- und Dreifaktorieller Varianzanalyse auch der Ausdruck „Ein-“, „Zwei-“ bzw. „Drei-Wege-ANOVA“ benutzt.

In Tabellen und Abbildungen entsprechen folgende Bezeichnungen diesen P-Werten:

n.s. $P > 0,05$ (nicht signifikant)

★ $P \leq 0,05$ (signifikant)

★★ $P \leq 0,01$ (sehr signifikant)

★★★ $P \leq 0,001$ (hoch signifikant)

III - 3. ERGEBNISSE

In Vorversuchen wurde zunächst geklärt, ob die auftretenden Unterschiede zwischen den Genotypen durch verschiedene Präferenzen (Präferenzen für kalorienreiche Flüssigkeiten, Präferenzen für oder Aversionen gegen verschiedene Geschmacksrichtungen, Platzpräferenzen etc.), durch Bevorzugen oder Vermeiden bestimmter Alkoholkonzentrationen oder durch unterschiedliche Kinetiken im Alkoholabbau bedingt sein könnten. Des Weiteren wurden die Gesamttrinkmengen beider Genotypen verglichen, mögliche Unterschiede des Enkephalinabbaus in Hirnpräparationen analysiert sowie der Einfluss der pharmakologischen Inhibierung der NEP bei wildtypischen Mäusen untersucht. Im Hauptteil der experimentellen Arbeiten wurde anhand zweier unterschiedlicher Paradigmen (an zwei unterschiedlichen Tiersets) der Einfluss von Stress auf den Alkoholkonsum der beiden Genotypen verglichen.

III - 3.1. Präferenztests

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass die hier und bei Siems et al. [Siems, 00] beschriebenen NEP-abhängigen Effekte auf den Alkoholkonsum kalorische oder geschmackliche Ursachen hatten. Dazu wurden sowohl wildtypischen als auch NEP-Knockout-Mäusen vom 1.-9. Tag zwei Flaschen mit Wasser zur freien Auswahl angeboten; von Tag 10 an enthielt eine der beiden Flaschen zusätzlich die in Tab. 3 angegebenen Substanzen. In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Präferenztests (Angabe als Verhältnis [Präferenzratio] des Verbrauchs der behandelten

Trinkflüssigkeit zur Gesamttrinkmenge) sowie die statistische Auswertung mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse eingetragen.

Tab. 3: Präferenztests für verschiedene Substanzen

Tag	Substanz (Konz. [mM])	Ratio \pm SEM (+/+)	Ratio \pm SEM (-/-)	Signifik.
1-9	—	0,481 \pm 0,054	0,563 \pm 0,052	n.s.
10-15	Saccharose 1,70% (m/V)	0,612 \pm 0,067	0,548 \pm 0,075	n.s.
16-22	Saccharose 4,25% (m/V)	0,725 \pm 0,051	0,642 \pm 0,069	n.s.
23-29	NaCl 0,9% (m/V)	0,174 \pm 0,041	0,301 \pm 0,074	n.s.
30-36	Chinin 0,03 mM	0,437 \pm 0,062	0,592 \pm 0,076	n.s.
37-47	Chinin 0,10 mM	0,504 \pm 0,060	0,526 \pm 0,061	n.s.
48-56	Chinin 0,25 mM	0,311 \pm 0,051	0,375 \pm 0,061	n.s.
57-71	Saccharin 0,033% (m/V)	0,612 \pm 0,039	0,593 \pm 0,047	n.s.
72-81	Saccharin 0,066% (m/V)	0,605 \pm 0,059	0,610 \pm 0,063	n.s.
82-86	—	0,530 \pm 0,087	0,536 \pm 0,087	n.s.
87-93	NaCl 0,9% (m/V)	0,147 \pm 0,009	0,172 \pm 0,037	n.s.

Die Ergebnisse der Präferenztests für verschiedene Substanzen bei je 8 Männchen NEP (-/-) und NEP (+/+) sind ausgedrückt als Präferenzratio („Ratio“). Der zeitliche Verlauf der Präferenzratio innerhalb eines Behandlungszeitraums wurde zwischen den Genotypen mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse verglichen.

n.s.: $P > 0,05$ (nicht signifikant)

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass etwaige Veränderungen im Trinkverhalten bei allen Testbedingungen jeweils beide Genotypen betreffen und dass zwischen den beiden Genotypen bei keiner der Testbedingungen ein statistisch signifikanter Unterschied auftrat. Die beiden Genotypen unterscheiden sich also weder durch ihr Bestreben, kalorienreiche oder süß schmeckende Trinkflüssigkeit zu sich zu nehmen noch durch eine Aversion gegen salzigen oder bitteren Geschmack. Die in den folgenden Tests auftretenden Unterschiede beim Alkoholverbrauch der beiden Genotypen können demnach nicht auf derartige Unterschiede im Geschmacksempfinden oder in der Motivation zur Kalorienaufnahme zurückgeführt werden.

Die NEP-Knockout- und Wildtypiere wurden zusätzlich in einem konditionierten Platzpräferenztest untersucht. Daraus ging kein Anhaltspunkt für eine veränderte Platzpräferenz der Knockout- gegenüber den Wildtypieren hervor (persönliche Mitteilung von B. Maul/FMP).

III - 3.2. Ermittlung einer geeigneten Alkoholkonzentration und der Gesamttrinkmenge

Um ein generelles Meiden oder Bevorzugen bestimmter Alkoholkonzentrationen auszuschließen, wurde für die anschließenden Versuche eine geeignete Alkoholkonzentration ermittelt. Zu diesem Zweck wurden Alkohol-naiven Mäusen zusätzlich zum Wasser Alkohollösungen in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 7,5, 10 und 15% [V/V]) angeboten. Bei den ersten drei Konzentrationen wurde bei steigender Konzentration der Lösung *innerhalb* eines Genotyps keine Veränderung der Präferenzratio beobachtet – lediglich die absolut konsumierte Alkoholmenge (in g/kg Körpergewicht/Tag) stieg. *Zwischen* den Genotypen ergaben sich weder in der Präferenzratio noch in der aufgenommenen Alkoholmenge Unterschiede. Bei einer Alkoholkonzentration von 15% (V/V) wurde allerdings ein starker Anstieg von Alkoholverbrauch und Gesamttrinkmenge beobachtet. Dies wurde durch die geringere Grenzflächenspannung dieser Lösung und das dadurch bedingte leichtere Auslaufen aus den Ventilen verursacht. Um dieses Phänomen einerseits zu vermeiden und andererseits den Versuchstieren eine ausreichend hohe Alkoholmenge anbieten zu können, wurden die folgenden Experimente mit 10%igen Alkohollösungen durchgeführt.

Das Trinkverhalten bezüglich der Gesamttrinkmenge wurde in drei von einander unabhängigen Versuchen jeweils über den gesamten Zeitraum ermittelt. Die Versuche waren hinsichtlich der eingesetzten Alkoholkonzentrationen sowie der stressfreien oder stressarmen Bedingungen verschieden gestaltet. Die dabei beobachteten Gesamttrinkmengen können deshalb innerhalb eines Genotyps von Versuch zu Versuch differieren. Trotz dieser unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde jedoch in allen drei Versuchen ein erhöhter Gesamtverbrauch der Knockout-Tiere gegenüber den Wildtypen beobachtet. Die Ergebnisse wurden durch Zweifaktorielle Varianzanalyse des zeitlichen Kurvenverlaufs (Genotyp x Zeit) statistisch verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 aufgeführt.

Der Einfluss des Genotyps auf die Gesamttrinkmenge unterstreicht die Bedeutung der Alkoholpräferenzratio bei der Beurteilung des NEP-abhängigen Alkoholkonsums. Die im Folgenden beschriebenen Versuche zum Alkoholverbrauch werden daher überwiegend durch die Präferenzratio ausgedrückt.

Tab. 4: Gesamttrinkmenge

	(+/+): Gesamttrinkmenge [g/kg/d] ± SEM	(-/-): Gesamttrinkmenge [g/kg/d] ± SEM	Sitzun- gen	Signi- fikanz
Versuch 1	119,1 ± 2,6 (N=10)	146,3 ± 2,6 (N=10)	39	★ ★ ★
Versuch 2	142,8 ± 2,4 (N=12)	155,5 ± 2,5 (N=12)	21	★ ★ ★
Versuch 3	120,7 ± 1,7 (N=16)	139,6 ± 1,7 (N=24)	47	★ ★ ★

Statistische Auswertung der Gesamttrinkmenge von NEP-Knockout- (-/-) und Wildtyp-Mäusen (+/+) aus drei von einander unabhängigen Versuchen nach Zweifaktorieller Varianzanalyse (Genotyp x Zeit, N = Anzahl der Tiere).

★ ★ ★: $P \leq 0,001$

III - 3.3. Alkoholabbau-Kinetik nach intraperitonealer Verabreichung

Differenzen zwischen den beiden Genotypen in der Verstoffwechselung des aufgenommenen Alkohols könnten das Alkohol-Trinkverhalten der Tiere nachhaltig beeinflussen. Um derartige Unterschiede im Alkohol-Metabolismus auszuschließen, wurden die Blutalkohol-Spiegel von 6 NEP (-/-) und 6 NEP (+/+) 2 bzw. 3 h nach intraperitonealer Gabe von Ethanol gemessen. Zu beiden Zeitpunkten unterschied sich der Blutalkohol-Spiegel der Knockout-Mäuse nach Zweifaktorieller Varianzanalyse (Genotyp x Zeit) nicht signifikant von dem der Wildtypen (2 h: $1,51 \pm 0,071$ mg/ml [-/-] vs. $1,37 \pm 0,108$ mg/ml [+/+] ; 3 h: $1,18 \pm 0,085$ mg/ml [-/-] vs. $0,99 \pm 0,090$ mg/ml [+/+]; $P = 0,0825$). Die in den folgenden Tests auftretenden Unterschiede zwischen den Genotypen in ihrem Alkohol-Trinkverhalten lassen sich also nicht auf einen verzögerten Abbau bei NEP-Defizienz zurückgeführt werden.

III - 3.4. Enkephalinabbau und Einfluss der Opioidrezeptoren

Physiologisch bedeutsame Substrate der NEP sind die Enkephaline *Leu*- bzw. *Met*-Enkephalin, weshalb das Enzym zeitweilig auch als „Enkephalinase“ bezeichnet wurde. Wegen des wichtigen Einflusses dieser Opioide auf suchtrelevante Vorgänge, wie z. B. die freiwillige Alkoholaufnahme [Gianoulakis, 04], könnte ein veränderter Abbau der Enkephaline in NEP-Knockout-Mäusen deren verändertes Alkohol-Trinkverhalten erklären. Deshalb wurde die Hydrolyse von *Leu*-Enkephalin durch Membranpräparationen verschiedener Hirnregionen aus NEP-Knockout-Mäusen mit denen wildtypischer Mäuse verglichen (n = jeweils 3, Zweifaktorielle Varianzanalyse). Wegen des ebenfalls bedeutenden Einflusses der APN auf den Enkephalin-Abbau

wurde dieses Enzym zusätzlich durch Bestatin (Aminopeptidase-Hemmer, insbesondere der APN) inhibiert. Abhängig von der untersuchten Hirnregion und vom Zusatz von Bestatin resultierte dabei folgendes differenziertes Muster: In Striatum ($P \leq 0,001$), Bulbus olfactorius ($P \leq 0,01$), Thalamus ($P \leq 0,05$) und Tegmentum/Colliculi ($P \leq 0,05$) von NEP-Knockout-Mäusen wurde Leu-Enkephalin unter Bestatin-Hemmung signifikant langsamer abgebaut als in den entsprechenden Regionen der Wildtypen (Abb. 11). Ohne Bestatin waren in diesen Regionen keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Im Cortex dagegen lief unter Bestatin-Hemmung bei beiden Genotypen die Peptid-Hydrolyse gleich schnell ab, ohne Bestatin wiederum bei den Knockout-Tieren signifikant langsamer ($P \leq 0,001$). Im Hippocampus und Auditorischen Cortex waren weder mit noch ohne Zusatz von Bestatin signifikant unterschiedliche Abbauraten zu beobachten.

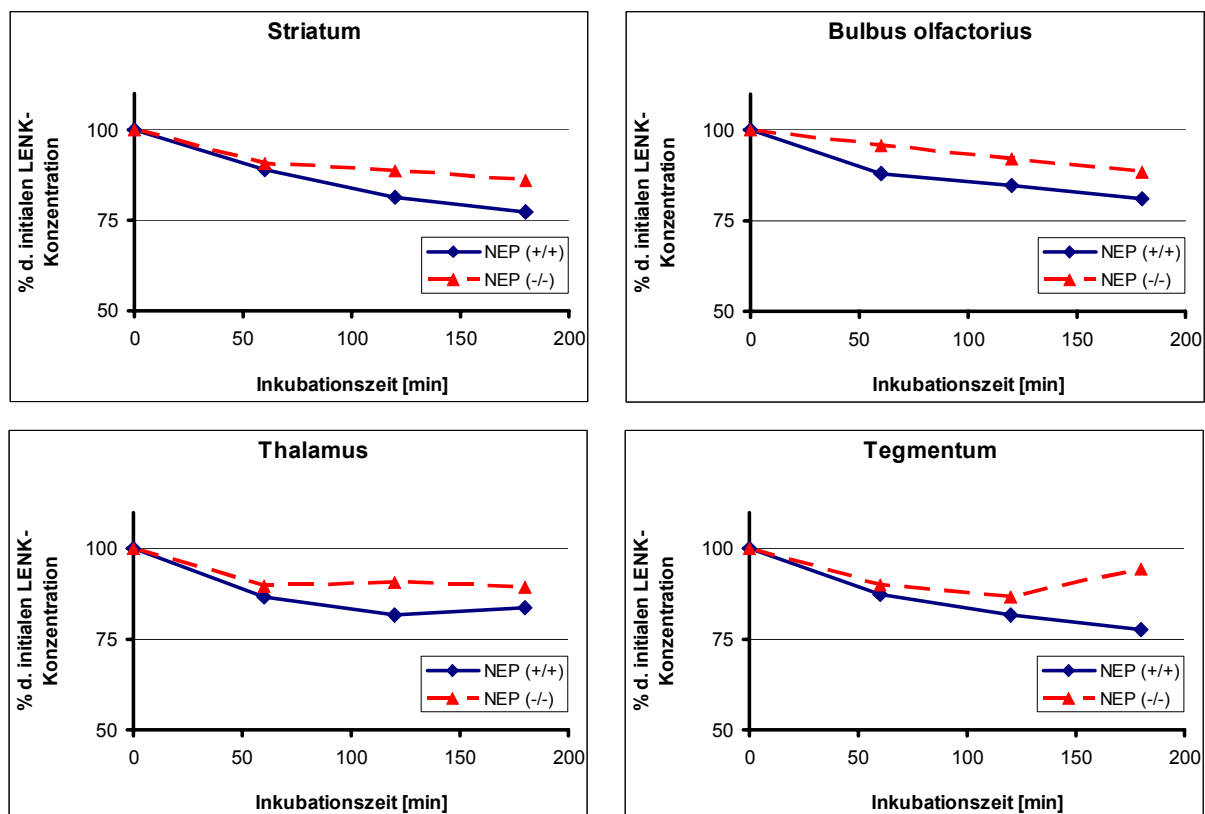


Abb. 11: Leu-Enkephalin-Abbau in ausgewählten Hirnregionen von NEP (-/-)- und NEP (+/+)-Mäusen. Der Abbau durch Aminopeptidasen wurde durch Bestatin gehemmt. Die Kurven wurden mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse (Genotyp x Zeit) verglichen ($n =$ jeweils 3; errechnete Signifikanzen siehe Text). Der atypische Kurvenverlauf der NEP (-/-) im Tegmentum ist vermutlich auf einen Ausreißer bei den 120-min-Werten zurückzuführen.

Falls das unterschiedliche Trinkverhalten durch regionale Differenzen im Enkephalin-Metabolismus oder durch unterschiedliche Enkephalin-Konzentrationen verursacht

sein sollte, müsste der Einsatz eines Opioid-Rezeptorantagonisten diesen Unterschied beseitigen oder zumindest deutlich beeinflussen. Die orale Applikation von Naltrexon in Dosen von 0,2 mg/kg/d über 2 mg/kg/d bis 5 mg/kg/d (jeweils über mindestens eine Woche, gelöst in beiden Trinkflüssigkeiten) erbrachte jedoch weder bei den Knockout- noch bei den Wildtyp-Mäusen eine Reduktion des Alkoholkonsums.

III - 3.5. Trinkverhalten unter NEP-Inhibierung durch Candoxatril

Um zu überprüfen, ob sich die von Siems et al. im Jahr 2000 [Siems, 00] beschriebenen Unterschiede zwischen NEP-defizienten und wildtypischen Tieren auch bei pharmakologischer Inhibierung der NEP bestätigen, wurde einem Teil von wildtypischen C57Bl/6-Mäusen im Futter der spezifische NEP-Inhibitor Candoxatril verabreicht und gleichzeitig allen Tieren freier Zugang zu Wasser und 10%igem Alkohol gewährt. In Analogie zu den bei Siems et al. beschriebenen Effekten an NEP-Knockout-Mäusen wurde in diesem Paradigma durch die Inhibition der NEP-Aktivität ein erhöhter Verbrauch an Alkohol beobachtet (Abb. 12A).

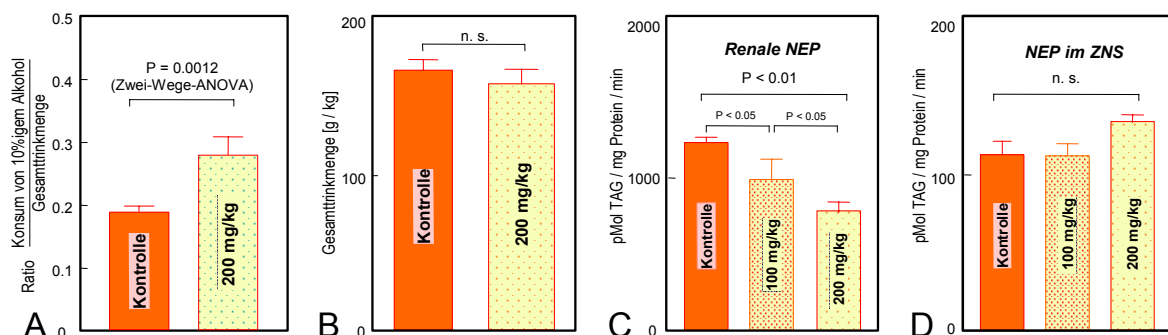


Abb. 12: Effekte von Candoxatril nach oraler Verabreichung auf (A) den Alkoholkonsum, ausgedrückt als Präferenzratio, (B) die Gesamtrinkmenge, (C) die renale NEP-Aktivität und (D) die NEP-Aktivität im ZNS.

Die Versuche in (A) und (B) wurden mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet, die Versuche in (C) und (D) mittels t-Test. Anzahl der Tiere: 8 pro Gruppe.

Die mit 200 mg Candoxatril/kg/d peroral behandelten Mäuse tranken im Durchschnitt mehr Alkohol als die unbehandelten und zeigten eine durchschnittlich erhöhte Präferenzratio (Abb. 12A). Die Auswertung des zeitlichen Verlaufs der Trinkmengen zeigte mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse (Behandlung x Zeit) eine signifikante Differenz ($P = 0,0137$ für den Alkoholverbrauch und $0,0012$ für die Präferenzratio).

Die Behandlung mit Candoxatril hatte keinen Einfluss auf die insgesamt getrunkene Flüssigkeitsmenge ($P = 0,2257$ nach Zweifaktorieller Varianzanalyse, Abb. 12B).

Die Applikation von Candoxatril führt nach unseren Experimenten zu keiner Reduktion der zentralen NEP-Aktivität. Dies steht im Gegensatz zum bisherigen Erkenntnisstand, dass diese Substanz – nach Metabolisierung des Prodrugs zur Wirkform Candoxatrilat – in ausreichendem Maße die Blut-Hirn-Schranke überwindet und dadurch auch im ZNS aktiv ist. Selbst in der für Mäuse relativ hohen Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht wurde in unseren Versuchen keine Reduktion der NEP-Aktivität in Gehirnmembran-Präparationen beobachtet (Abb. 12D). Dagegen ergab sich auch schon in geringeren Candoxatril-Konzentrationen eine signifikante Reduktion der peripheren NEP-Aktivität (Abb. 12C). Der spezifische NEP-Inhibitor Candoxatril übt also trotz einer ausschließlich peripheren NEP-Hemmung einen Einfluss auf das Trinkverhalten aus. Die molekularen Ursachen für diesen unerwarteten Effekt sind noch unklar.

III - 3.6. Trinkverhalten unter Stress

Wie in der Einleitung erwähnt, wurden sämtliche zuvor beschriebenen Trinkversuche nach einem Paradigma durchgeführt, das sich von dem bei Siems et al. [Siems, 00] beschriebenen Versuchsaufbau unterschied (siehe auch Methoden und Diskussion). In diesem Versuchsschema tranken die NEP-Knockout-Mäuse signifikant mehr Alkohol als ihre wildtypischen Kontrollen. Die wesentlichen Unterschiede im Versuchsaufbau bestanden in der Käfigbelegung, in der Gestaltung des Käfiginnenraums sowie in den äußeren Bedingungen des Tierlabors. In den hier beschriebenen Versuchen wurden die Tiere (I) in Gruppen von zwei statt fünf Tieren gehalten, (II) waren diese zwei Tiere zusätzlich durch eine durchsichtige, mit Löchern versehene Plexiglaswand getrennt, und (III) wurde hier gezielt versucht, die stressenden Einflüsse aus der Umgebung (Tierlabor) zu minimieren.

Bei dem Versuch, die Ergebnisse aus Siems et al. zu reproduzieren, konnten in den oben beschriebenen Vorversuchen keine Unterschiede im Alkohol-Trinkverhalten beider Genotypen festgestellt werden. In den bereits beschriebenen Vorversuchen wurden lediglich nach stressenden Situationen (Versuchsbeginn, Umsetzen der Tiere, Entfernen der Trennwände) kurzzeitige Abweichungen von diesem

einheitlichen Trinkverhalten registriert. Daher wurde postuliert, dass diese sporadisch auftretenden Differenzen und das bei Siems et al. beschriebene unterschiedliche Trinkverhalten die Folge einer stressinduzierten und Genotyp-abhängigen Situation waren. Folglich sollte nun unter den neuen, stressärmeren Versuchsbedingungen zunächst ein Basisniveau des Alkoholkonsums gefunden werden, das danach durch einen definierten Stress verändert werden sollte.

III - 3.6.1. „1. Stressversuch“

Anschließend an die stressarme Eingewöhnungsphase wurden die Tiere nun dem nach Koolhaas et al. [Koolhaas, 97] stärksten Stressor ausgesetzt – sozialem Stress. Dieser Stress erfolgte zunächst durch das Herausnehmen der Plexiglaswand, worauf sich die beiden jeweils in einem Käfig befindlichen Tiere als „Eindringlinge“ angriffen. Da zuvor für jeden Käfig jeweils zwei Brüder ausgewählt wurden, die auch bereits vor Versuchsbeginn in einem gemeinsamen Käfig saßen, und diese Brüderpaare anschließend nur durch die durchsichtige und mit Löchern versehene Plexiglaswand von einander getrennt waren, fielen diese sozialen Rangkämpfe nicht so heftig aus, wie sie von einander völlig fremden Männchen zu erwarten wären.

Nach einer Übergangsphase, in der die aufgenommene Alkoholmenge abnahm und die getrunkene Wassermenge stark anstieg (Tag 29-37), stellte sich der erwartete Zustand ein (Abb. 13): Während sich die Alkoholpräferenzratio der Wildtypen kaum veränderte, nahm die Ratio der NEP-Knockout-Mäuse im Vergleich zur *Prae-stress*-Phase deutlich zu. Auch im direkten Vergleich zu den Wildtypen während desselben Zeitraums lag die Alkoholpräferenzratio der Knockout-Mäuse signifikant höher (Tag 38-57). Dieser Zustand hielt mindestens 18 Tage an; danach glichen sich die Ratios beider Genotypen wieder auf ein Niveau an, das mit dem Zustand vor Herausnehmen der Trennwände vergleichbar war (Tag 58-74).

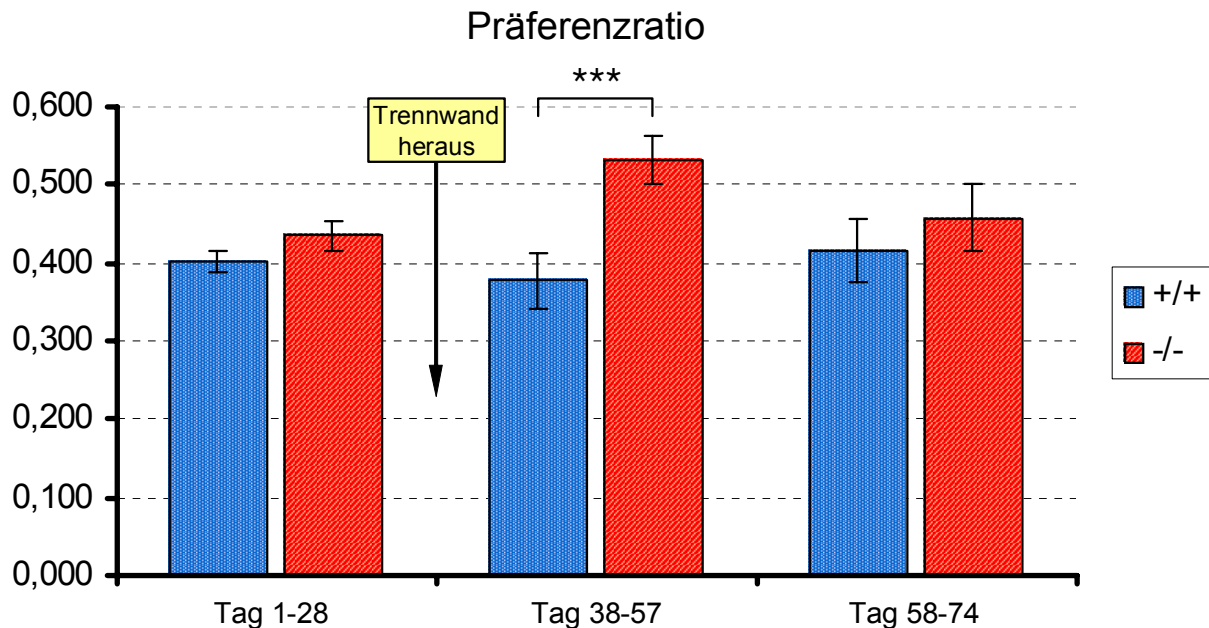


Abb. 13: „1. Stressversuch“: Präferenzratio vor (Tag 1-28) und nach Herausnehmen der Trennwand (Tag 39-57), sowie nach erneutem Angleichen der Ratios (ca. 3 Wochen nach Herausnehmen der Trennwand).

Mit blau sind die wildtypischen und mit rot die Knockouttiere gekennzeichnet. Die Werte der Übergangsphase (Tag 29-37) wurden in der Abbildung nicht dargestellt. Die Werte von je 12 männlichen NEP (-/-) und NEP (+/+) wurden in jeder der drei Phasen durch t-Test analysiert. Eine Zweifaktorielle Varianzanalyse konnte nicht durchgeführt werden, da nach Herausnehmen der Trennwände die Anzahl der Messwerte halbiert wurde (nach dem Herausnehmen resultierte für die jeweils zwei Tiere eines Käfigs nur eine Präferenzratio).
 ***: $P \leq 0,001$

III - 3.6.2. „2. Stressversuch“

Da bei derartigen Versuchen auch zufällige und unkontrollierbare Einflüsse vorübergehend zu ähnlichen Resultaten führen können, sollten diese Ergebnisse noch nach einem etablierten und stärkeren Stressparadigma bestätigt werden. Dazu wurde das oben beschriebene Versuchsschema mit neuen NEP-Knockout- und Wildtyp-Tieren zu einem Resident-Intruder-Paradigma modifiziert. In einer Gewöhnungsphase wurde den Tieren zunächst Wasser und danach sowohl Wasser als auch Alkohol-Lösungen in steigenden Konzentrationen angeboten. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden zur Ermittlung einer geeigneten Alkoholkonzentration verwendet (siehe oben). Anschließend begann der in der folgenden Grafik und Tabelle dargestellte Hauptversuch. Beginnend mit „Tag 1“ wurde jeweils ein Tier aus dem Versuch an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils maximal 1 min in einen ihm fremden Käfig zu fünf männlichen Mäusen gesetzt, dann innerhalb dieses Käfigs von diesen Tieren wie oben beschrieben für

15 min durch eine Plexiglaswand getrennt und anschließend in seinen „Heimkäfig“ zurückgesetzt.

Nach einer als „akut“ zu bezeichnenden Phase des Übergangs (Tag 22 bis 25), in der der Alkoholverbrauch und die Präferenzratio beider Genotypen absanken, blieb die Alkoholpräferenzratio der Wildtypen auf diesem niedrigeren Niveau (Abb. 14, Beobachtungsabschnitt Nr.2). Dies war aber auf eine leicht gestiegene Gesamttrinkmenge zurückzuführen – die berechnete Menge des aufgenommenen reinen Alkohols blieb gleich. Die Knockouttiere dagegen zeigten – wie schon im ersten Stressparadigma – eine deutliche Response auf den Stressor: Nachdem es während der akuten Stressphase ebenfalls zu einem kurzzeitigen Abfall des Alkoholverbrauchs kam, nahm die Präferenz der Knockouttiere anschließend für drei Wochen deutlich zu. Diese Zunahme zeigte sich sowohl im Vergleich zu den wildtypischen Tieren im gleichen Zeitraum als auch im Vergleich zu den Werten der Knockouttiere in der Phase vor dem Stress. Ca. drei Wochen nach dem Stress hatten sich die Alkoholpräferenz-Ratios von Knockout- und Wildtyp-Tieren wieder angeglichen und zeigten keinen signifikanten Unterschied mehr.

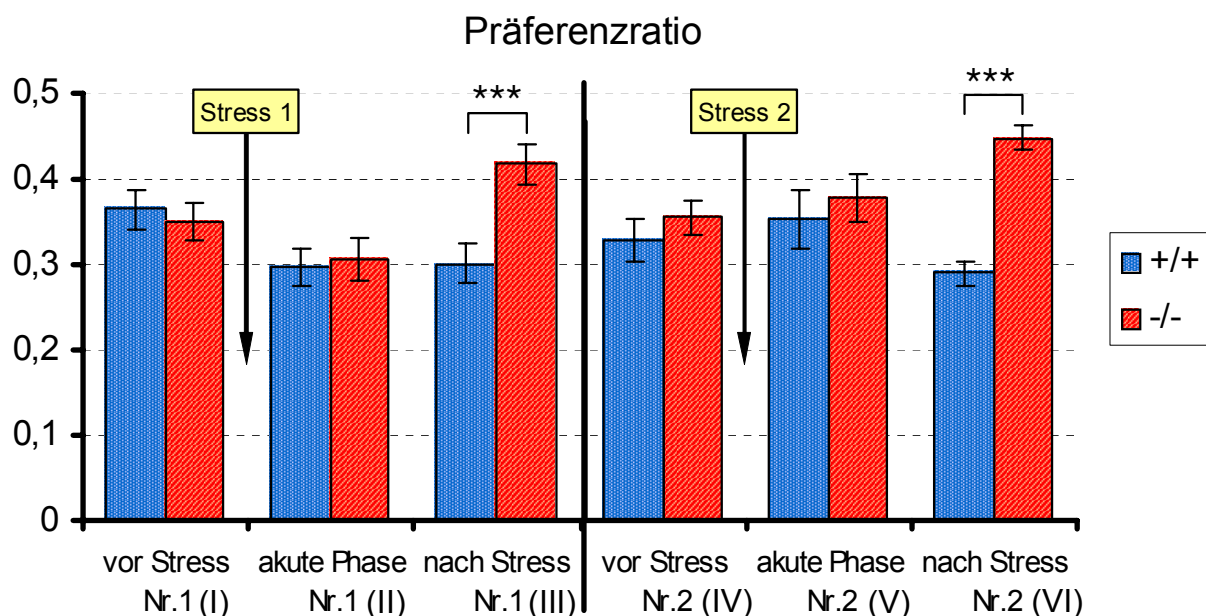


Abb. 14: Präferenzratio vor, während und nach zweier Phasen sozialen Stresses.

Mit blau sind die wildtypischen und mit rot die Knockouttiere gekennzeichnet. Die Beobachtungsabschnitte um die beiden Stressphasen herum sind mit „Nr.1“ bzw. „Nr.2“ gekennzeichnet, die einzelnen Phasen mit lateinischen Zahlen. Angaben zur Statistik siehe Tab. 5. ***: $P \leq 0,001$

In Analogie zu dem Vorgehen bei Sillaber et al. [Sillaber, 02] ist abschließend die Reproduzierbarkeit dieses Stresseffektes untersucht worden. Dazu wurden dieselben Tiere erneut dem oben beschriebenen Stress-Schema unterworfen (Abb. 14, Beobachtungsabschnitt Nr.2). Zunächst zeigte sich ein vergleichbares Bild wie im zuvor beschriebenen Abschnitt. Während jedoch nach dem ersten Stress die Unterschiede zwischen den Genotypen maximal drei Wochen anhielten, blieben Alkoholverbrauch und Präferenzratio der NEP-defizienten Mäuse bis zum Versuchsende (ca. 10 Wochen nach dem 2. Stress) signifikant erhöht.

In Tab. 5 (oberer Teil) wurden die Kurvenverläufe (Präferenzratio) beider Genotypen innerhalb einer Phase durch Zweifaktorielle Varianzanalyse miteinander verglichen. Dabei ergaben sich in den *Post-stress*-Phasen hoch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen, wogegen während der *Prae-stress*- und akuten Phasen keine statistisch signifikanten Differenzen nachweisbar waren.

Zusätzlich wurden *innerhalb eines Genotyps* die Mittelwerte jeweils zweier ausgewählter Zeiträume durch Monofaktorielle Varianzanalyse verglichen (unterer Teil von Tab. 5). Dabei stellte sich folgendes Bild heraus: Bei den Wildtypen waren lediglich geringe Unterschiede zwischen Phase I und III, I und IV sowie V und VI nachweisbar. Bei den NEP-Knockout-Mäusen gab es dagegen wesentlich stärkere Veränderungen im Zeitverlauf: Neben den bereits beschriebenen starken Anstiegen der Alkoholpräferenzratio nach dem Stress und dem Abfallen der Ratio nach Phase III wurden – wie erwartet – keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden *Prae-stress*-Phasen I und IV beobachtet; auch die beiden *Post-stress*-Phasen III und VI waren auf gleich hohem Niveau. Lediglich die akute Phase V zeigte eine unerwartete Erhöhung, was mit einer unklaren und daher willkürlichen festgelegten Trennung von Phase VI erklärbar ist.

Tab. 5: Alkoholpräferenzratio aus dem 2. Stressversuch.

Vergleich der Alkoholpräferenzratio innerhalb der einzelnen Phasen (durch Zweifaktorielle Varianzanalyse)				
Verglichene Gruppen	Mittelwerte ±SEM (gesamter Zeitraum)		Diffe- renz	Sign.
	(+/+)	(-/-)		
I Phase vor Stress Nr.1 (Tag 1-21)	0,355 ±0,022 g	0,354 ±0,021 g	-0,001	n.s.
III Phase nach Stress Nr.1 (Tag 26-48)	0,302 ±0,023 g	0,418 ±0,023 g	0,166	★ ★ ★
IV Phase vor Stress Nr.2 (Tag 49-70)	0,327 ±0,025 g	0,356 ±0,020 g	0,054	n.s.
VI Phase nach Stress Nr.2 (Tag 86-158)	0,291 ±0,014 g	0,448 ±0,013 g	0,157	★ ★ ★
Vergleich der Alkoholpräferenzratio innerhalb der (+/+)-Tiere				
Phase I vs. Phase III			★	
Phase I vs. Phase IV			★	
Phase III vs. Phase IV			n.s.	
Phase III vs. Phase VI			n.s.	
Phase IV vs. Phase VI			n.s.	
Vergleich der Alkoholpräferenzratio innerhalb der (-/-)-Tiere				
Phase I vs. Phase III			★ ★ ★	
Phase I vs. Phase IV			n.s.	
Phase III vs. Phase IV			★ ★	
Phase III vs. Phase VI			n.s.	
Phase IV vs. Phase VI			★ ★ ★	

Statistische Auswertung von 24 NEP-Knockout- (-/-) und 16 Wildtyp-Mäusen (+/+) in den im Text und in Abb. 14 beschriebenen Phasen. Im oberen Teil der Tabelle und in Abb. 14 wurden innerhalb der einzelnen Phasen beide Genotypen mit einander verglichen (Multivariate Varianzanalyse nach Pillai-Spur mit anschließendem t-Test). Die akuten Phasen II und V wurden zur Illustration in Abb. 14 eingezeichnet – auf deren statistische Auswertung wurde allerdings (wegen der dadurch zunehmenden Komplexität des statistischen Verfahrens) verzichtet.

In den beiden unteren Teilen der Tabelle wurde die Veränderung innerhalb eines Genotyps während verschiedener Phasen analysiert (Auswertung durch multivariate Varianzanalyse). n.s.: $P > 0,05$; ★: $P \leq 0,05$; ★★: $P \leq 0,01$; ★★ ★: $P \leq 0,001$

III - 4. DISKUSSION

Neben im Laufe des Lebens erworbenen Faktoren (Erziehung, soziales Umfeld, negative Erlebnisse/„Schicksalsschläge“, religiöse Vorschriften etc.) spielen vererbte Komponenten, also Gene und ihre Genprodukte, eine wichtige Rolle für das Verlangen nach Alkohol. Dies ließ sich experimentell an genetisch modifizierten Tieren – besonders mit Knockout-Tiermodellen – sowie beim Menschen anhand von Zwillingsstudien zweifelsfrei belegen [Crabbe, 02; National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), 92].

Zu den Genprodukten, die mitverantwortlich für den individuellen Alkoholkonsum bzw. für die erhöhte Motivation zur Aufnahme alkoholischer Getränke sind, gehören vor allem [nach Cowen, 04; Enoch, 03]

- Dopamin + dessen Rezeptoren vom Typ 1 und 2
- endogene Opiode (besonders β -Endorphin und die Enkephaline) + deren Rezeptoren (vor allem bestimmte Splice-Varianten des μ -Opioidrezeptors),
- NPY + verschiedene Rezeptorsubtypen
- Glutamat + dessen NMDA-Rezeptorsubtypen oder
- Serotonin + verschiedene Rezeptorsubtypen.

Neuere Erkenntnisse belegen jedoch auch auf molekularer Ebene, dass Differenzen im Trinkverhalten, die durch genetischen Komponenten bewirkt werden, durch Verhaltensfaktoren wie Angst und Stress deutlich beeinflusst oder gar erst durch diese induziert werden [Brady, 99; Gordon, 02]. Von besonderem Interesse sind die bereits erwähnten Ergebnisse von Sillaber et al. [Sillaber, 02], nach denen der Einfluss des CRH1-Rezeptors auf den Alkoholkonsum erst durch einen wiederholten kurzzeitigen Stress ausgelöst wird.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, dass auch die NEP einen modulierenden (genauer: einen nivellierenden) Einfluss auf das Stressgeschehen ausübt. Dass das Enzym selbst ebenfalls durch Stressmediatoren reguliert werden kann, ist u. a. aus Zellmodellen bekannt, jedoch handelte es sich in diesen Fällen meist um die Regulierung durch Mediatoren von z. B. oxidativem

Stress [dazu u. a. Toyoda, 02]. Dieser Weg – die Regulierung der NEP durch Stressmediatoren nach einer Stressexposition – kann jedoch in unseren Versuchen keine entscheidende Rolle spielen, da hier nur die Tiere, denen das Enzym fehlt, eine starke Stressantwort zeigen. Bei den wildtypischen Kontrollen wurde dagegen keine deutliche Stressantwort beobachtet, obwohl nur sie das Signal in der Reihenfolge Stress → NEP weiterleiten könnten. Es ist daher vorstellbar, dass die Wildtypen dank eines modulierenden Einflusses der NEP besser mit dem Stressgeschehen umgehen als die NEP-defizienten Tiere. Ein möglicher Einfluss des Alkohols auf die NEP-Aktivität wird unten besprochen.

III - 4.1. Die Rolle von CRH und anderen peptidischen Mediatoren

Die NEP katalysiert mit hohen Turnover-Raten die Hydrolyse einer Reihe von Peptiden, die Einfluss auf die freiwillige Alkoholaufnahme oder allgemein auf die Selbstverabreichung von Sucht auslösenden Substanzen haben (u. a. NPY, Met- bzw. Leu-Enkephalin, Ang II). NEP-defiziente Mäuse sind folglich ein interessantes Modell zur Analyse einer veränderten Selbstverabreichung von Alkohol und anderen Substanzen mit Abhängigkeitspotential. Theoretisch sollten NEP-defiziente Tiere veränderte Abbauraten, daraus resultierend höhere Konzentrationen der genannten Peptide und dadurch eine veränderte Motivation zur Selbstverabreichung Sucht auslösender Substanzen haben. Dies war unter den stressarmen Anfangsbedingungen unseres Versuchsaufbaus allerdings nicht der Fall. Da die oben genannten Substrate jedoch weniger im Zusammenhang mit Stress stehen, kommen sie kaum als Mediatoren für den erhöhten Alkoholkonsum unter Stressbedingungen in Frage.

Zu den Substraten der NEP, die außer bei Suchtvorgängen auch beim Stressgeschehen eine wesentliche Rolle spielen, gehört vor allem das oben erwähnte Corticotropin-Releasing Hormon (CRH, bzw. Corticotropin-Releasing Faktor, CRF). Dass CRH ein gutes Substrat der NEP ist, wurde im Jahr 2003 durch Ritchie et al. publiziert [Ritchie, 03], was in eigenen Untersuchungen anhand unterschiedlicher Enzymquellen bestätigt werden konnte. In der genannten Publikation wird der Umsatz des CRH durch die NEP als sehr effektiv beschrieben. Der K_m -Wert der Reaktion liegt mit 42 μM nur wenig über dem der Substanz P (siehe Einleitung).

Die Bedeutung von CRH im Stressgeschehen ist ausführlich beschrieben worden [u. a. in Timpl, 98]. Obwohl der CRH-Einfluss auch auf die Alkoholaufnahme mehrfach untersucht wurde [Sarnyai, 01], konnte jedoch noch nicht ausreichend belegt werden, ob CRH eher fördernd oder hemmend auf die Selbstverabreichung von Alkohol wirkt. Die meisten Versuche gehen von der externen, invasiven Verabreichung des Peptids aus, was in der Regel zu einer Reduktion der Alkoholaufnahme führte. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine invasive (meist periphere) Verabreichung von Substanzen lediglich allgemeine Konzentrationsänderungen ohne distinkten Bezug zu relevanten Hirnregionen bewirkt. Außerdem können invasive Applikationstechniken durch den dadurch ausgeübten Stress die Motivation zur freiwilligen Alkoholaufnahme massiv beeinflussen [O'Callaghan, 02]. Der letztere Punkt ist natürlich besonders für die Verabreichung von CRH zu beachten, die eigentlich unter völlig stressfreien Bedingungen geschehen sollte.

Der Einfluss von CRH wurde jedoch auch bereits mit Hilfe nicht-invasiver Methoden untersucht, z. B. in CRH-Knockout-Mäusen [Olive, 03]. Durch das Fehlen des CRH-Gens konsumierten die Tiere doppelt so viel Alkohol wie die Wildtypen, zeigten aber auch eine reduzierte Sensitivität auf die lokomotorischen Reize und belohnenden Effekte von Ethanol. Die Verknüpfung des Einflusses von CRH auf den Alkoholkonsum in Kombination mit Stressfaktoren wurde kürzlich am Beispiel des CRH-Rezeptors untersucht. Die Arbeitsgruppe um Spanagel nutzte für ihre Untersuchungen CRH1-Rezeptor-Knockout-Mäuse und konnte so auf invasive Applikationstechniken verzichten [Sillaber, 02]. Im Anschluss an wiederholte Stressperioden kam es bei den CRH-Rezeptor-Knockout-Mäusen zu einem starken, lang anhaltenden Anstieg des Alkoholkonsums, nicht jedoch bei den wildtypischen Kontrollen. Mit diesen Untersuchungen wurde ein neuer Ansatzpunkt für das genetisch bedingte, stressinduzierte Trinken gefunden.

Die eigenen Ergebnisse zur Stressabhängigkeit der freiwilligen Alkoholaufnahme in „Two-bottle-free-choice-Experimenten“ entsprechen den Ergebnissen aus der Spanagel-Gruppe insofern, als auch in unseren Versuchen eine Stressexposition die Alkoholkonsumption bei den (NEP-)Knockout-Mäusen ansteigen ließ und mehrfache Stressexposition zu einem verstärkenden, dann aber über Wochen und Monate anhaltenden Effekt führte, wobei die Tiere dem Stressor nur für jeweils kurze Zeiträume (wenige Minuten) ausgesetzt waren. Die wildtypischen Kontrolltiere in

unseren und den zitierten Versuchen reagierten auf die Stressexposition nach identischem Behandlungsschema *nicht* mit einem Anstieg der Alkoholkonsumption. Das deutet darauf hin, dass auch die NEP auf Prozesse der Stressverarbeitung wesentlichen Einfluss nimmt.

Die molekularen Ursachen für das unterschiedliche Trinkverhalten von NEP-Knockout-Mäusen und ihren wildtypischen Wurfgeschwistern sind unklar. Betrachtet man die auffällige Parallelität der eigenen Untersuchungen mit den Ergebnissen von Sillaber et al., so wäre ein Einfluss des NEP-Substrates CRH nahe liegend. Ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Spanagel-Gruppe besteht jedoch darin, dass bei deren Tieren das CRH wegen der Rezeptor-Defizienz nicht zur Wirkung kommt, während bei den NEP-Knockout-Tieren primär von einem erhöhten CRH-Spiegel (als Folge der Ausschaltung eines CRH-abbauenden Enzyms) auszugehen ist. Als mögliche Erklärungen dafür kommen in Frage:

- Der chronisch erhöhte CRH-Spiegel hat den Rezeptor desensibilisiert (wie z. B. bei einer so genannten Insulin- oder Leptin-Resistenz).
- Andere Enzyme kompensieren die NEP-Funktion in Bezug auf den CRH-Abbau.
- Indirekt vermittelte Effekte sind von Bedeutung. Spanagel beobachtete bei seinen Tieren beispielsweise eine Up-Regulation einer NMDA-Rezeptor-Untereinheit.
- Es ist noch nicht ausreichend geklärt (s. oben), ob erhöhte CRH-Spiegel eher fördernd oder hemmend auf den Alkoholkonsum wirken. So wurden in der Amygdala von Alkohol-präferierenden Ratten sowohl erniedrigte [Hwang, 04] als auch erhöhte CRH-Spiegel [Richter, 00] gefunden. Darüber hinaus zeigte sich, dass nach akuter Alkoholapplikation die CRH-Freisetzung ansteigt. Bei chronischer Alkoholgabe sank dagegen das Maß der CRH-Freisetzung, d. h. eine Toleranz entwickelte sich [Redei, 88; Rivier, 84].
- Das Fehlen der NEP, als Peptidase mit einem breiten Substratspektrum, resultiert in der Up-Regulation weiterer Neuropeptide, die die Selbstverabreichung von Alkohol beeinflussen.

Solche Überlegungen lassen sich auch zu anderen NEP-Substraten, die im Zusammenhang mit Stress stehen, anstellen, z. B. zur Substanz P. Auch hier ist der

Abbau durch die NEP gut belegt und mit einem K_m -Wert von 31,9 μM sehr effektiv [Matsas, 84]. Der größte Teil der Publikationen zur Substanz P beschäftigt sich mit ihrer großen Bedeutung im Stress- und Entzündungsgeschehen. Inzwischen gibt es aber auch Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Substanz P und dem Verlangen nach Alkohol [Slawecki, 01]. In dieser Arbeit wurden u. a. erniedrigte Substanz P-Spiegel in Hirnregionen von Alkohol-präferierenden Ratten gemessen. In NEP-Knockout-Mäusen ist dagegen der Substanz P-Spiegel (z. B. im Colon) wie zu erwarten erhöht [Sturiale, 99]. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Befund, dass Substanz P ihrerseits scheinbar auch die NEP regulieren kann: Die Stimulation von Zellen mit Substanz P führte zu einem Anstieg der NEP-Expression [Bae, 02]. Auch eine Hemmung der CRH-induzierten Stressantwort durch Substanz P wurde in Hypophysen-Zellen gefunden [Melzig, 98]. Weitere Kandidaten für einen Zusammenhang NEP-Substrat – Stressachse – erhöhter Alkoholkonsum sind u. a. Cholecystokinin (CCK) und Glucagon-Like Peptid 1 (GLP-1) [Moller, 02; Gulpinar, 04].

Die Erörterung eines für die Stress-Response unserer Versuche verantwortlichen Mediators – vermutlich eines Substrates der NEP – ist z. Z. spekulativ und kann nur durch weiterführende, ausgedehnte Untersuchungen der in Frage kommenden Peptide (u. a. zu Peptidkonzentrationen in ausgewählten Hirnregionen der Knockout- und Wildtyp-Mäuse nach dem Trinkversuch) beantwortet werden. Die Auffindung eines solchen peptidischen Mediators kann zur Erforschung der Stressabhängigkeit der Alkoholkrankheit beitragen. Der Alkoholkonsum wird, wie bereits erwähnt, in vielen Fällen wesentlich durch Stress beeinflusst, z. B. beim so genannten „Stresstrinker“ oder bei dem Rückfälligwerden eines abstinenten Alkoholkranken (auch noch Jahre nach einem erfolgreichen Entzug) beim Auftreten stark stressender Situationen. Das hier beschriebene Modell der NEP-Knockout-Maus könnte wegen seiner deutlichen Stressabhängigkeit ein geeignetes Versuchsobjekt zur Identifizierung der genannten Mediatoren darstellen.

III - 4.2. Wechselseitige Beziehungen zwischen NEP, Alkoholaufnahme und Stressgeschehen

Obwohl hier dargelegt wurde, dass eine direkte, stressunabhängige Beeinflussung des Alkoholkonsums durch die NEP eher unwahrscheinlich ist, sollen zwei Arbeiten

erwähnt werden, die auf eine kausale Rolle der NEP hinweisen. Nachdem Soleilhac et al. berichteten, dass die lösliche NEP im Serum von Untertage-Kohlearbeitern vermutlich aufgrund der Staubeinwirkung erhöht ist [Soleilhac, 96], konnten Frette et al. zeigen, dass die Aktivität der Serum-NEP mit dem Alkoholkonsum signifikant korreliert, nicht aber mit dem Nicotinkonsum [Frette, 98]. Die errechneten Korrelationskoeffizienten waren allerdings nicht sehr hoch. Unklar ist auch, ob möglicherweise auch andere externe Faktoren wie Stress, Ernährung etc. zwischen den Personengruppen differierten.

In unserem Versuchsansatz ist dagegen der basale Alkoholverbrauch unter stressarmen Bedingungen in den NEP-defizienten Tieren nicht verändert. Erst nach Applikation eines starken sozialen Stressreizes reagieren die NEP-defizienten Tiere mit einem über Wochen erhöhten Alkoholverbrauch. Die wesentlichen Faktoren, die zu diesem gegenüber den Ergebnissen von Siems et al. differenzierteren Verhalten führten, wurden unter „Ergebnisse“ bereits erwähnt: Erstens wurden diese Tiere in Gruppen von je fünf Männchen gehalten. Dadurch kam es innerhalb der Gruppen zu Rankämpfen und der Ausprägung einer sozialen Rangordnung, welche nachgewiesener Maßen die freiwillige Aufnahme von psychotropen Substanzen beeinflusst [Morgan, 02]. Aus diesem Grund wurden in unseren neuen Versuchen die Tiere in Gruppen von nur zwei Männchen pro Käfig gehalten und – als zweite Änderung – durch eine teilweise mit Löchern versehene, durchsichtige Trennwand separiert.

Ein weiterer störender Faktor der älteren Experimente bestand in dem erhöhten Stress durch äußere Faktoren in dem Tierlabor. Die Anzahl der in diesem Laboratorium gehaltenen Tiere war beträchtlich größer als in dem hier beschriebenen Experiment. Dadurch war die Frequenz der Tierpflege (Füttern, Tränken, Umsetzen) wesentlich erhöht, außerdem wurden in dem Raum auch andere Tierarten gehalten, darunter Ratten und Hähne. Dass unterschiedliche Umgebungen (trotz standardisierter Grundbedingungen) einen empfindlichen Einfluss auf verschiedene Verhaltenstests und auf das Trinkverhalten darstellen können, wurde vor allem in den letzten Jahren häufiger diskutiert und auch eindrucksvoll in einer Arbeit von John Crabbe bestätigt [Crabbe, 99]. In unseren hier beschriebenen Versuchen wurde daher – als dritte Änderung – die Gesamtzahl (nur Mäuse und Ratten) in dem Tierlabor gering gehalten und auf eine möglichst

niedrige Begehungsfrequenz geachtet. Auch die Haltungsbedingungen innerhalb des Käfigs sind von Bedeutung; deshalb wurde zur Minimierung des basalen Stresses in den neuen Versuchen Zellstoff für den natürlichen Nestbautrieb hinzugefügt („*enriched environment*“).

Ein solches Versuchsschema mit basal möglichst stressarmen Bedingungen – von der Käfighaltung bis hin zu den räumlichen und tierpflegerischen Gegebenheiten – sollte für zukünftige weiterführende Experimente strikt eingehalten werden. Aus der erwähnten Publikation von Crabbe et al. geht auch hervor, dass schon geringfügige Veränderungen der Rahmenbedingungen, wie der Wechsel des Tierlabors, zu völlig unterschiedlichen Trinkergebnissen führen können. Dies gilt umso mehr für derartig stressensitive Experimente.

Wie eingangs bereits erwähnt, muss bei der Bewertung des Einflusses der NEP auf den Alkoholkonsum auch noch der umgekehrte Weg diskutiert werden: die Wirkung des Alkoholkonsums auf die NEP. Ein solcher Einfluss wurde in weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe beobachtet. In den Versuchen von B. Maul, A. Winkler und W.-E. Siems am FMP (bisher unveröffentlicht) wurden vier Gruppen von Wistarratten unterschiedlichen Trinkparadigmen unterworfen: Die erste Gruppe bekam nur Wasser und fungierte als Kontrollgruppe. Die zweite bekam zunächst für mehrere Wochen nur Wasser und gegen Ende der Versuchsreihe für zwei gesonderte Perioden nur 10%igen Alkohol („forcierte Trinker“), die dritte Gruppe bekam zunächst nur Wasser und in den zwei gesonderten Perioden Wasser und 10%igen Alkohol zur freien Auswahl („kontrollierte Trinker“). Die vierte Gruppe schließlich bekam zunächst für mehrere Wochen Wasser und Alkohol zur freien Auswahl, was in den zwei gesonderten Perioden durch alleiniges Angebot von Wasser unterbrochen wurde („abhängige Trinker“).

Folgende Beobachtungen hinsichtlich bestimmter Enzyme wurden gemacht: Die NEP-Aktivität war in 4 von 8 Hirnregionen der abhängigen Trinker (Cortex, Thalamus, Auditor. Cortex Tegmentum/Colliculi) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und zeigte darüber hinaus eine auffallende Tendenz zum Grad der Alkoholabhängigkeit. Bei den kontrollierten Trinkern und in geringerem Ausmaß bei den forcierten Trinkern wurden z. T. ebenfalls erhöhte NEP-Aktivitäten registriert. Dagegen zeigt sich lediglich bei den forcierten Trinkern eine Erhöhung der ACE-Aktivität. Für die APN war keine klare Beziehung zum Alkoholkonsum feststellbar. In

NEP-Knockout-Mäusen wurde dagegen keine signifikante Veränderung von ACE oder APN beschrieben [Siems, 00], d. h. dass zwei andere wichtige Enkephalin-abbauende Enzyme nicht gegenreguliert sind und daher nicht die Funktion der fehlenden NEP übernehmen. In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei NEP-defizienten Tieren enzymatische Gegenregulationen prinzipiell bekannt sind. So wurden z. B. bei NEP-Knockout-Mäusen erhöhte Abbauraten natriuretischer Peptide beschrieben [Walther, 04].

Unsere Beobachtung eines direkten Zusammenhanges zwischen NEP-Aktivität und Alkoholkonsum wird durch andere Publikationen gestützt [Panchenko, 84; Beliaev, 83a], in denen bei Mäusen bzw. Ratten, die an Alkohol gewöhnt waren, die Serum- bzw. Hirn-Aktivitäten der NEP meist erhöht waren. Die Bestimmung von Ursache und Wirkung in der Beziehung zwischen Alkoholkonsum und NEP kann aus den vorliegenden Daten nicht erbracht werden. Für eine kausale Rolle des Alkoholkonsums sprechen die letztgenannten Untersuchungen. Aus den Daten von Soleilhac bzw. Frette et al. lässt sich dagegen eher eine ursächliche Rolle der NEP ableiten, da die Untertagearbeiter mit der höheren NEP-Aktivität signifikant mehr Alkohol tranken als vergleichbare Arbeiter im Tagebau [Frette, 98; Soleilhac, 96]. Die hier vorgelegten Untersuchungen an NEP-Knockout-Mäusen sprechen ebenfalls mehr für die ursächliche Rolle der NEP, bringen allerdings zusätzlich den Einfluss des Stresses ins Spiel. Der Zusammenhang zwischen NEP und Alkoholkonsum ist wahrscheinlich komplexer und ist vermutlich von gegenseitiger Beeinflussung gekennzeichnet.

III - 4.3. Einfluss von NEP-Inhibitoren auf den Alkoholkonsum

Aus pharmakologischer Sicht ist der Einfluss von NEP-Inhibitoren auf den Alkoholkonsum von besonderem Interesse, da sich einerseits mehrere internationale Pharmakonzerne (z. B. Pfizer, Schering, Solvay) mit der Entwicklung von NEP-Inhibitoren befassen und andererseits in der Literatur ein direkter Zusammenhang zwischen der NEP-Aktivität und der Alkoholaufnahme beschrieben wird (s. Einleitung). Um den Einfluss spezifischer NEP-Inhibitoren auf den Alkoholkonsum zu überprüfen wurden 8 Wildtyp-Mäuse mit dem Pfizer-Inhibitor Candoxatril behandelt, von dem zunächst angenommen wurde, dass er in der eingesetzten Konzentration die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Die Auswertung mit

Zweifaktorieller Varianzanalyse über einen Zeitraum von mehreren Wochen ergab einen signifikant erhöhten Alkoholkonsum in der Candoxatril-Gruppe verglichen mit den unbehandelten Tieren. Die Ergebnisse sind schwierig zu interpretieren, da nach Abschluss des Trinkversuches keine Überwindung der Blut-Hirnschranke nachgewiesen werden konnte. Die NEP-Aktivität in der Niere wurde dagegen eindeutig gehemmt. Eine Beeinflussung des Alkoholkonsums, vermittelt durch periphere, z. B. diuretische Effekte, ist jedoch wegen der gleich bleibenden Gesamttrinkmenge wenig wahrscheinlich. Über einen molekularen Mechanismus kann bei der derzeitigen Datenlage nur spekuliert werden: So könnte sich der durch die NEP-Hemmung veränderte Katabolismus von Peptiden in Niere, Darm und/oder anderen peripheren Organen auf das ZNS auswirken, falls es sich dabei um Neuropeptide handelt, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Um sicher ausschließen zu können, dass sich der Alkoholverbrauch von Bluthochdruck-Patienten bei Behandlung mit diesem Wirkstoff erhöht oder dass sogar aktive oder abstinente Alkoholiker davon betroffen werden, müssen noch weitere, breiter angelegte Tierversuche mit dieser Substanz erfolgen.

IV. NEP UND ÜBERGEWICHT

IV - 1. EINLEITUNG

Übergewicht ist mittlerweile ein allgegenwärtiges Problem in der industrialisierten Welt, und Fettleibigkeit wird von der WHO unter den zehn größten globalen Gesundheitsproblemen eingestuft. In den Medien wird Übergewicht nicht mehr nur als kosmetisches Problem betrachtet, sondern immer häufiger auf dessen gesundheitliche Risiken und Folgekrankheiten hingewiesen. Inzwischen sind auch einzelne Länder auf höchster Ebene in die Offensive gegangen, wie z. B. das US-amerikanische Gesundheitsministerium, das unter Tommy Thompson „der Fettsucht-Epidemie den Kampf angesagt“ hat [Schoeller, 04]. Wenig später stellte auch die damalige deutsche Ministerin für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Renate Künast, ihre Initiative „Plattform Ernährung und Bewegung“ vor [Künast, 04]. Angesichts alarmierender Statistiken kommen diese Programme keinesfalls zu früh, müssen ihre Effektivität aber erst noch unter Beweis stellen.

In den Vereinigten Staaten stieg die Prävalenz der Fettleibigkeit (oder „Fettsucht“) mit einem Body-Mass-Index (BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ von 12,0% der erwachsenen Bevölkerung im Jahr 1991 über 17,9% im Jahr 1998 auf 19,8% im Jahr 2000 [Mokdad, 01] (zur Definition des BMI und der Grade der Adipositas siehe unten). Fast 64% der Population, das entspricht etwa 130 Mio. US-Amerikanern, waren nach Stand von 2003 übergewichtig oder fettleibig, die direkten und indirekten Folgekosten belaufen sich auf geschätzte 117 Mrd. \$ jährlich [Schoeller, 04]. In Deutschland wiesen 1998 31,1 bis 48,7% einen BMI zwischen 25,0 und 29,9 auf und waren somit mäßig übergewichtig, 18,3 bis 24,5% der Bundesbürger im Alter von 18 bis 79 Jahren hatten einen BMI ≥ 30 [Bergmann, 99]. An extremer Fettsucht mit einem BMI $> 40 \text{ kg/m}^2$ leiden z. Z. allein in Deutschland 800.000 Menschen, das entspricht etwa 1% der Bevölkerung [Herpertz, 03]. Damit weisen nur noch etwa ein Drittel der Deutschen ein gesundheitlich wünschenswertes Gewicht auf. Schätzungen der direkten und indirekten Krankheitskosten der Adipositas und der Folge- bzw.

Begleiterkrankungen für 1995 ergeben je nach Modellvariante zwischen 7,75 und 13,5 Mrd. € (das sind 3,1 bis 5,5% der Gesamtkosten) [Schneider, 96]; nach anderen Schätzungen sind es sogar bis zu 18 Mrd. € pro Jahr [Herpertz, 03].

Adipöse Patienten haben eine signifikant erhöhte Mortalität [Allison, 99], ebenso Komorbiditäten wie Dyslipidämien, Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und andere Gesundheitsstörungen wie Gallenblasenerkrankungen, Schlafapnoe, osteoarthritische bzw. orthopädische Beeinträchtigungen sowie verschiedene Krebsarten [Kral, 01; Solomon, 97].

Der BMI ist definiert als das Körpergewicht in Kilogramm geteilt durch das Quadrat der Körperhöhe in Metern. Ein gesunder Body-Mass-Index scheint bei Erwachsenen zwischen 18,5 (nach anderen Angaben 20) und 24,9 kg/m² zu liegen. Ein BMI von 18,5 bis 24,9 kg/m² wird als Normalgewicht bezeichnet. Übergewicht oder Adipositas Grad I wird bei einem Body-Mass-Index von 25 bis 29,9 kg/m², Fettsucht oder Adipositas Grad II von 30 bis 39,9 kg/m² und eine extreme Fettsucht (Adipositas Grad III) bei einem Body-Mass-Index von >40 kg/m² angenommen. Der BMI berücksichtigt allerdings nicht die Fettverteilung am Körper, die z. B. in die gluteofemorale (hüftbetonte) oder gynoide Form und die wesentlich risikoreichere abdominale (stammbetonte) oder androide Form unterteilt werden kann. Ebenso wenig kann mit dem BMI der Knochenbau oder der Anteil von Fett- bzw. Muskelmasse am Gesamtgewicht einberechnet werden. Er wird heute jedoch wegen seiner leicht handhabbaren Formel und der guten Relation zu Morbidität und Mortalität (trotz der oben genannten Einwendungen) übereinstimmend zur Einteilung und Klassifikation der Adipositas heran gezogen.

IV - 1.1. Mögliche Ursachen für Übergewicht

Heute ist erwiesen, dass die Ursachen für die Entwicklung eines übermäßigen Körpergewichtes sehr vielfältig sind. Sie können physiologischer, psychischer, genetischer und umweltbedingter Natur sein [Barsh, 00]. Am einfachsten ausgedrückt kann Übergewicht nur entstehen, wenn die Energieaufnahme den Energieverbrauch übersteigt.

Unser heutiger Alltag ist durch einen unbegrenzten Zugang zu wohlschmeckender, relativ preiswerter, energiereicher Nahrung gekennzeichnet, ebenso wie durch einen

Lebensstil, der uns nur eine geringe physische Aktivität abverlangt. Unter diesen Umständen tritt Übergewicht zwangsläufig immer häufiger auf, denn das Energiegleichgewicht ist deutlich in Richtung der Aufnahme verschoben. Außerdem hat der Körper im Laufe der Evolution exzellente physiologische Mechanismen zur Abwehr eines Gewichtsverlustes entwickelt, während er nur schwache Strategien gegen die Akkumulation von Energiespeichern besitzt, solange genügend Nahrung vorhanden ist [Hill, 03].

Deshalb wird die überschüssige Energie in Form von Triglyceriden im Fettgewebe gespeichert. Die gesteigerte Masse an Fettgewebe kann sich als gesteigerte Zellgröße, Zellzahl oder beides manifestieren (hypertrophe bzw. hyperplastische Adipositas), wobei bei einer erhöhten Anzahl der Fettzellen die Vergrößerung des Fettgewebes theoretisch unbegrenzt ist [Kordik, 99].

IV - 1.2. Molekulare Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme

Der Appetit, das Hungergefühl und die Intention zur Nahrungsaufnahme allgemein werden durch eine komplexe Interaktion hervorgerufen, die zwischen Signalen aus verschiedenen Körperorganen und diversen Hirnregionen besteht. Diese Regelmechanismen können demnach in periphere Bereiche und solche des ZNS unterteilt werden.

Der Hypothalamus, der sich am Boden des Zwischenhirns (Diencephalon) befindet, spielt bei der Integration der Signale aus Peripherie und ZNS eine bedeutsame Rolle; deshalb kommt ihm auch bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme – oder zumindest bedeutsamer Elemente dieses Kontrollsystems – eine zentrale Rolle zu [Hirsch, 92]. Aber auch die Hypophyse und in der Peripherie Magen, Darm, Nebennieren und Pankreas haben gewichtige Kontrollfunktionen auf das Körpergewicht. Erst in den letzten Jahren dagegen ist bekannt geworden, dass auch das Fettgewebe einen einflussreichen Regelkreis darstellt und sogar als eigenes endokrines Organ aufgefasst werden kann [Ahima, 00].

Die sehr komplexen Steuerkreise in den einzelnen Organen sowie ihre Vernetzung untereinander werden bis heute nur ansatzweise verstanden. Eine ständig wachsende Literatur unterstützt die Hypothese, dass die Nahrungsaufnahme innerhalb eines vielschichtigen und sehr empfindlichen Systems der

Energiehomöostase gesteuert wird. Die Energiehomöostase wird durch ein höchst effektives, stark verknüpfted neurohumorales Netzwerk bewirkt, das den Einfluss kurzfristiger Fluktuationen der Energiebalance auf das Körpergewicht minimiert. Dies erklärt auch, warum bei den meisten Menschen das Körpergewicht über Jahre und sogar über ein ganzes Leben relativ stabil bleibt.

Eine Beispielrechnung soll das verdeutlichen: Eine Person, die über die letzten 5 Jahre 10 kg zusätzlich im Fettgewebe abgelagert hat, hat damit ca. 800.000 kcal ($1 \text{ kcal} \cong 4,18 \text{ kJ}$) akkumuliert. Diese gespeicherte Energie ist nur ein Bruchteil der enormen Menge von ca. 4 bis 5 Mio. kcal, die in den 5 Jahren durch den Körper geflossen sind. Damit hat diese Person täglich nur 40 überschüssige kcal zu sich genommen, das entspricht nur etwa 1,5% der insgesamt pro Tag aufgenommenen Energie. Folglich reicht ein Bruchteil dessen, was man isst – akkumuliert über einen größeren Zeitraum – aus, um das Körpergewicht deutlich zu verändern. Dass dies trotz der täglich sich unterscheidenden Portionen in der Regel nicht so ist, spricht also für das regulierende System der Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase, das über verschiedene periphere Organe und diverse Hirnareale verteilt ist.

Ein Großteil der daran beteiligten Transmitter ist peptidischer Natur. Die wichtigsten peptidischen und nichtpeptidischen sind in Tab. 6 dargestellt. Sie sind in komplizierte Regelkreise eingebunden, die sich gegenseitig beeinflussen und sowohl periphere als auch zentralnervöse Komponenten beinhalten. Diese Regelmechanismen sind sehr komplex und oft noch nicht vollständig verstanden. Am Beispiel des Leptins sollen hier die komplizierten Wechselwirkungen derartiger Hormone kurz veranschaulicht werden.

Das so genannte „Sättigungshormon“ Leptin wird nach einer aufgenommenen Mahlzeit im weißen Fettgewebe ausgeschüttet und gelangt über die Blutbahn und einen noch nicht genau bekannten Transportmechanismus (vermutlich über die Bindung an Leptin-Rezeptoren) in das ZNS. Dort bindet es unter anderem im Nucleus arcuatus (NArc) des Hypothalamus an die Leptin-Rezeptoren von so genannten NPY/AGRP-Neuronen und von POMC/CART-Neuronen (Erklärung der Peptid-Abkürzungen siehe Tab. 6). Diese Neurone 1. Ordnung projizieren auf weitere Regionen des Hypothalamus, vor allem auf den paraventriculären Nucleus (PVN), den lateralen Hypothalamus (LHA) und die perifornikale Area (PFA). Nach Ausschüttung der Neuropeptide aus diesen Neuronen werden Neurone 2. Ordnung

aktiviert, die ihrerseits im PFA und LHA über orexigene (die Nahrungsaufnahme stimulierende) Peptide wie die Orexine und MCH die Energieaufnahme steigern, bzw. im PVN über anorexigene (die Nahrungsaufnahme inhibierende) Peptide wie TRH, CRH und Oxytocin die Energieaufnahme hemmen.

Tab. 6: Endogene Mediatoren (Neuropeptide, Neurotransmitter, Hormone) mit Effekt auf das Körpergewicht.

Nahrungs- bzw. Energieaufnahme ↑ oder Metabolismusrate ↓	Nahrungs- bzw. Energieaufnahme ↓ oder Metabolismusrate ↑
Peptidische Mediatoren	
<u>NPY</u> (Neuropeptid Y) <u>MCH</u> (Melanin-konzentr. Hormon) <u>Ghrelin</u> <u>Galanin</u> GALP (Galanin-Like Peptid) <u>Orexin A</u> und B Opioide (β-Endorphin, Dynorphin) <u>AGRP</u> (Agouti-Related Peptid) NPW/NPB (Neuropeptide W/B) Beacon GHRF (Growth-Hormon-Releasing Faktor) 26RFa	Leptin α-MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon, = Melanocortin) <u>CRH</u> (CRF; Corticotropin-Releasing Faktor/Hormon) <u>PYY</u> (Peptid YY 3-36) Glucagon <u>GLP-1</u> (Glucagon-Like Peptid 1) <u>GRP-10</u> (Gastrin-Releasing Peptid 10) TRH (Thyrotropin-Releasing Hormon) IL-1β (Interleukin 1β) IL-6 (Interleukin 6) <u>CCK</u> (Cholecystokin-8) <u>CART</u> (Cocain- und Amphetamin-reguliertes Transkript) Urocortin <u>Neurotensin</u> Enterostatin Amylin <u>Oxytocin</u> <u>Bombesin</u> <u>Somatostatin</u>
Nichtpeptidische Mediatoren	
Noradrenalin (über α ₂ -Rezeptor) GABA (γ-Amino-Buttersäure)	Noradrenalin (über α ₁ - und β ₁ -Rezeptor) Adrenalin Serotonin Dopamin Histamin

Unterstrichen sind Peptide, von denen der Abbau durch die NEP belegt ist. Gestrichelt unterstrichen sind Peptide, bei denen – abgeleitet aus der Struktur der Verbindungen – ein Abbau durch die NEP von uns vermutet und untersucht wurde (siehe Ergebnisse).

Tab. 6 zeigt die oben genannten Transmitter und weitere wichtige Mediatoren der Nahrungsaufnahme bzw. Energiehomöostase und –utilisation, geordnet nach einem

positiven bzw. negativen Effekt auf das Körpergewicht. Diese Einteilung ist z. T. willkürlich, weil einige Mediatoren entgegengesetzte Wirkungen ausüben können, z. B. Noradrenalin (je nach Rezeptorsubtyp). Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie beinhaltet nicht nur orexigene bzw. anorexigene Mediatoren, sondern auch solche,

- die die Energieaufnahme bzw. den Energieverbrauch regulieren sowie solche,
- die die Speicherung von Energie in endogenen Energiespeichern bzw. die Freisetzung von Energie aus endogenen Energiespeichern beeinflussen.

und damit allgemein die Stoffwechselrate (Metabolismusrate) positiv bzw. negativ beeinflussen.

IV - 1.3. Bedeutung der NEP für peptidische Mediatoren

Begünstigt durch Fortschritte in der Molekularbiologie und Gentechnik wurden seit Anfang der Neunziger Jahre in verstärktem Maße spezifische Tier- (meist Maus-) Modelle zur Untersuchung der molekularen Zusammenhänge von Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase und der damit zusammenhängenden Entwicklung von Übergewichtigkeit herangezogen. Dabei wurden verschiedene Ansätze verfolgt:

Einerseits wurden die Gene bestimmter Signalmoleküle (Peptide oder andere kleine Moleküle mit Hormon- oder Transmitter-Charakter) bzw. deren Rezeptoren in Mausstämmen durch gentechnische Methoden ausgeschaltet oder überexprimiert, bei denen aufgrund vorheriger Versuche ein Einfluss auf das Körpergewicht vermutet wurde. Solche Knockout-Stämme bzw. transgenen Linien wurden u. a. für das Neuropeptid Y (NPY), Proopiomelanocortin (POMC), den PPAR γ -Rezeptor (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), das Melanin-konzentrierende Hormon (*melanin-concentrating hormone, MCH*) oder Interleukin 6 (IL-6) entwickelt [Barsh, 00; Leibowitz, 04]. Mit diesen Modellen konnten die empirischen Befunde bestätigt und die Zusammenhänge zur molekularen Steuerung des Körpergewichts eingehender charakterisiert werden.

Ein anderer Ansatz geht davon aus, bei bereits etablierten und phänotypisch gut charakterisierten Zuchtstämmen mithilfe molekularbiologischer Methoden Mutationen

in den Genen für Proteine festzustellen, die vorher nicht bekannt waren oder deren Funktion im Zusammenhang mit der Gewichtsregulation unbekannt war. Dabei wurden so bedeutende Entdeckungen gemacht wie die, dass der seit langem bekannte *ob*-Mausstamm eine Mutation im Gen für das Protein Leptin aufweist und dadurch eine extreme Fettleibigkeit entwickelt [Zhang, 94]. Weitere Adipositas-Tiermodelle, für die ebenfalls die molekulare Ursache aufgeklärt wurde sind die Yellow-*(A^y)*-Maus (Agoutiprotein-Mutation) [Duhl, 94], die Diabetes-*(db)*-Maus (Leptinrezeptor-Mutationen) [Chen, 96] bzw. das homologe Modell der Fatty-*(fa)*-Zucker-Ratte [Phillips, 96], die Tubby-*(tub)*-Maus (Mutation im Tub-Protein) [Kleyn, 96] sowie die Obese-*(fat)*-Maus [Naggert, 95]. Meist handelt es sich dabei um Mutationen in den Genen für Rezeptoren bzw. für Proteine (oder deren Präkursoren), welche Hormon- oder Neurotransmitter-Charakter haben.

Dass auch peptidolytische oder proteolytische Enzyme in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten, ist zwar durch biochemische Kenntnisse und daraus folgenden theoretische Überlegungen zum Abbau orexigener/anorexigener Peptide durch Enzyme weithin akzeptiert. Bisher gab es hierfür jedoch kaum praktische Bestätigungen aus Tiermodellen. Zwar wurden einerseits für einige direkt am Fettstoffwechsel beteiligte Enzyme wie die HMG-CoA-Reduktase, die Lipoproteinlipase (LPL) oder die Hormon-sensitive Lipase (HPL) ausführlich die Aktivitäten oder mRNA-Spiegel in übergewichtigen bzw. untergewichtigen Tieren untersucht und/oder anhand von Knockout-Tiermodellen bestätigt [Steinmetz, 01; Olivecrona, 85; Haemmerle, 02; Steinmetz, 01; Olivecrona, 85; Haemmerle, 02]. Andererseits findet sich – mit Ausnahme der Carboxypeptidase E (CPE) und der Prohormonconvertasen (PC 1 bis 3) (siehe unten) – in diesem Zusammenhang kaum Literatur mit Knockout-Modellen proteolytischer Enzyme. Auch sind nur wenige Versuche zur Beeinflussung des Fettgewichtes durch Inhibitoren proteolytischer Enzyme bekannt. Eine prominente Ausnahme bildet das ACE (siehe unten), bei dem jedoch das Studiendesign im Allgemeinen auf eine Aussage zu kardiovaskulären Parametern ausgerichtet war. Evtl. beobachtete Reduktionen des Körpergewichts sind nie Gegenstand gezielter Untersuchungen gewesen und solche Resultate wurden in der Regel als sekundäre Erscheinungen diskutiert. Zum Einfluss weiterer proteolytischer Enzyme auf das Körpergewicht bietet die Literatur dagegen kaum Daten.

Den klassischen Ansatzpunkt zur Therapie der Adipositas stellen in der Regel spezifische Agonisten oder Antagonisten der oben beschriebenen Mediatoren der Energiehomöostase dar. Peptidasen bieten dagegen einen neuartigen Ansatzpunkt für die Therapie von krankhaftem Übergewicht. Die Beeinflussung (in der Regel Hemmung) dieser peptidolytischen Enzyme moduliert fast immer die Konzentration *mehrerer* Peptidhormone, und das schließt die Auswirkungen auf mehrere Ligand-/Rezeptor-Systeme mit Einfluss auf die Fettleibigkeit ein. Ein pharmakologischer Eingriff an solch einem höher angesiedelten Target kann auf Grund der geringeren Spezifität der Einflussnahme ein Nachteil sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Therapie einer typisch „multigenetischen Erkrankung“ wie die der Adipositas die Beeinflussung mehrerer Komponenten geradezu erfordert. Im Laufe der Evolution hat der Körper exzellente Mechanismen gefunden, bei Störung eines Regelkreises dessen Funktion durch mehrere andere Regelkreise zu kompensieren. Bei Beeinflussung eines höheren Steuermechanismus, wie der für den Mediator-Metabolismus verantwortlichen Enzyme, sind dagegen zugleich mehrere Regelkreise betroffen, die sich nun gegenseitig weniger kompensieren können. Es kann dadurch zu einer zwar weniger prononcierten, durch die schlechtere Kompensation aber umso wirksameren Beeinflussung des Körpergewichts kommen. Der Gesamteffekt einer solchen Enzymbeeinflussung sowie die Chancen und Risiken einer pharmakologischen Inhibierung müssen anhand von pharmakologischen Studien und von Knockout-Tiermodellen untersucht werden.

Wie oben erwähnt, ist der Einfluss des ACE auf das Körpergewicht bzw. das Körperfett bereits bekannt [Engeli, 03], und der Einfluss von ACE-Hemmern auf das Körpergewicht ist durch deren langjährige Anwendung relativ gut belegt. Durch die Wirkung von ACE-Inhibitoren wurde wiederholt eine Reduktion des Körpergewichts beobachtet [Sharma, 04]. Die molekularen Ursachen einer Gewichtsabnahme unter ACE-Hemmung sind bisher unklar. Es ist nicht auszuschließen, dass – auch angesichts der relativ kurzen Beobachtungszeiträume – diuretische Effekte und kardiovaskuläre Wirkungen zur Gewichtsabnahme geführt haben. Einige Arbeiten konnten allerdings eine Reduktion des Körpergewichtes durch Beeinflussung des Fettstoffwechsels belegen [Ortlepp, 02]. Untersuchungen an gentechnisch veränderten Mäusen, die eine, zwei oder drei Kopien des ACE-Gens trugen, weisen dagegen in eine andere Richtung: Mäuse mit drei Kopien wiesen bei fettreicher Diät

ein geringeres Körpergewicht und weniger periepididymales Fettgewebe auf als Mäuse mit einer oder zwei Kopien [Heimann, 04].

Bei Anwendung von NEP-Inhibitoren wurden Veränderungen des Körpergewicht nur selten gezielt verfolgt, und wenn, dann meist bei relativ kurzfristiger Anwendung. Lediglich zwei Arbeiten beschreiben die stimulierende Wirkung der relativ selektiven NEP-Inhibitoren Thiorphan und Acetorphan auf die Futteraufnahme [Riviere, 87; Bado, 89] nach einmaliger oraler oder peripherer Applikation. Nach intracerebroventrikulärer Verabreichung von Thiorphan kam es dagegen zu einer Reduktion der Futteraufnahme.

Die Wirkungen des spezifischen NEP-Inhibitors Candoxatril bzw. seines aktiven Metaboliten Candoxatrilat wurden durch die Fa. Pfizer über mehrere Jahre intensiv untersucht. Die meisten dieser Experimente wurden nur über wenige Wochen geführt oder das Körpergewicht wurde nicht untersucht. Lediglich eine Arbeit von Arnal et al. gibt hinreichende Informationen: Bei oraler Gabe von täglich 50 mg Candoxatril/kg Körpergewicht über 4 Monate wurde keine Zunahme des Körpergewichts festgestellt. Interessanterweise konnte der gleichfalls getestete duale NEP-/ACE-Inhibitor Omapatrilat die Einlagerung von Fettpolstern bei Apolipoprotein E-defizienten Mäusen wirkungsvoll vermindern, wogegen sich Candoxatril in diesem Punkt nicht von den Kontrollen unterschied [Arnal, 01].

Zwei der wenigen publizierten Knockout-Tiermodelle, in denen der direkte Zusammenhang zwischen Peptidasen und erhöhtem Körpergewicht oder Körperfettanteil untersucht wurde, sind Mäuse, die entweder für verschiedene Prohormonconvertasen oder die CPE eine Defizienz aufweisen. Bei den Prohormonconvertasen wurde ein Zusammenhang zum Körpergewicht schon länger vermutet, da diese Enzyme viele Prohormone wie GHRH, Proopiomelanocortin (POMC), Proinsulin oder Proglucagon zu einer Reihe stoffwechselaktiver Hormone umsetzen. Knockout-Tiermodelle dieser Convertasen sind seit einiger Zeit verfügbar – neben deutlichen Veränderungen in Körpergewicht und Fettstoffwechsel weisen diese Tiere jedoch weitere schwerwiegende Schädigungen auf. Diese schränken den Nutzen des Tiermodells für die Erforschung der Regulierung des Körpergewichtes durch die Convertasen ein [Seidah, 99; Zhu, 02]. Bei der CPE war dieser Zusammenhang zum Körpergewicht weniger vorhersehbar. Seit längerer Zeit war allerdings das Modell der *fat*-Maus bekannt, welches durch Adipositas und

Hyperglycämie gekennzeichnet ist. 1995 konnte die molekulare Ursache dafür in einer Mutation im CPE-Gen aufgeklärt werden, die die Aktivität des Enzyms nahezu vollständig unterdrückt [Naggert, 95]. Für die Futteraufnahme und den Energiehaushalt wichtige Peptide wie z. B. Leu-Enkephalin liegen im Gehirn der *fat*-Mäuse stark erhöht vor [Fricker, 96]. Interessanterweise ist die Aktivität der Convertasen PC 1 und 2 in den *fat*-Mäusen ebenfalls reduziert [Berman, 01]

IV - 1.4. Aufgabenstellung

In diesem Zusammenhang war es eine interessante Bestätigung der oben beschriebenen Theorie, als in unserer Arbeitsgruppe bei NEP-Knockout-Mäusen ein erhöhtes Körpergewicht und vermehrt abdominale Fettansammlungen beobachtet wurden. Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um zunächst das erhöhte Körpergewicht quantifizieren zu können, weiterhin wichtige metabolische und biochemische Parameter zu charakterisieren und schließlich erste Erklärungsansätze der molekularen Mechanismen dieser Ergebnisse zu liefern.

IV - 2. METHODEN

IV - 2.1. Allgemeine Bemerkung

Die physiologischen, metabolischen und biochemischen Untersuchungen wurden an Gruppen von NEP-Knockout-Mäusen und deren wildtypischen Kontrollen (C57BL/6) bzw. an Material, das von diesen entnommen wurde, durchgeführt. Zunächst werden hier die einzelnen Versuchstiergruppen und Untersuchungen vorgestellt. Im Anschluss sind jedoch zur Verbesserung der Übersichtlichkeit die Methoden und Ergebnisse thematisch angeordnet.

IV - 2.2. Beschreibung der Tiergruppen

Der größte Teil der Untersuchungen wurde an der Forschungseinrichtung Experimentelle Medizin in Berlin-Steglitz (FEM) durchgeführt. Dort wurden an einer Tiergruppe (im Folgenden „**Gruppe 1**“ genannt) erste umfangreiche Daten zum

Körpergewicht und zum Einfluss unterschiedlicher Futtersorten (retrospektiv) gesammelt. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden die folgenden Experimente geplant. Diese Daten wurden an einer neuen Tiergruppe („**Gruppe 2**“) bestätigt. Deren Untergruppen wurden auf beide Genotypen, Männchen und Weibchen sowie pelletiertes und extrudiertes Futter (im nächsten Abschnitt beschrieben) aufgeteilt. Die Mäuse wurden zu zweit in Makrolonkäfigen Typ II (26 x 21 x 14 cm) unter Zugabe eines Papiertuchs gehalten. Im Alter von 6 und 12 Monaten erfolgte in regelmäßigen Abständen die Bestimmung des Futtermittelsverbrauchs. Nach Beendigung des Versuches (ungefähr in ihrem 15.-16. Lebensmonat) wurden die Tiere getötet, Glucose- und Ketonwerte im Blut gemessen, Organe entnommen (und deren Gewicht bestimmt) und Serum gewonnen sowie der Hypothalamus für spätere Enzymanalytik präpariert. An einer weiteren Tiergruppe am FEM wurden die Tiere auf ihre orale Glucosetoleranz getestet („**Gruppe 3**“).

Am Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung in Bergholz-Rehbrücke (DIfE) erfolgte die Bestimmung der Körperzusammensetzung von weiblichen Knockout- und Wildtypmäusen („**Gruppe 4**“) über einen Zeitraum von 8 Monaten (Kooperation mit R. Kluge, Abteilung Pharmakologie, H. G. Joost). Diese Tiere erhielten entweder Standardfutter (vergleichbar mit dem nachfolgend beschriebenen pelletierten Futter) oder fett- und energiereicheres Futter. Nach Beendigung dieses Teilversuches wurde der Energiestoffwechsel der Tiere (Respiratorischer Quotient und abgegebene Wärmemenge) kalorimetrisch bestimmt. Zu Versuchsende wurden die Tiere getötet und Organe entnommen sowie Serum gewonnen und der Body-Mass-Index ermittelt.

Am Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztier in Dummerstorf (FBN) wurden Organe von zwei dort gezüchteten Mausstämmen („**Gruppe 5**“, Beschreibung siehe Ergebnisse) entnommen und deren NEP-Aktivität bestimmt.

IV - 2.3. Versuchstiere und deren Haltung

Zucht und allgemeine Haltungsbedingungen waren analog zu den Experimenten zum Alkoholkonsum (s. Kap. III - 2.1); Wasser und Futter erhielten die Tiere ad libitum. Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen Typ II bzw. Typ III (jedoch *ohne* Trennwand) in unterschiedlicher Anzahl pro Käfig gehalten (in der Regel 2 – 5 Tiere).

Ausschließlich in Typ II-Käfigen wurden die Gruppen 2, 3 und 6 gehalten, die Gruppe 4 ausschließlich in Typ III-Käfigen. Je nach Anzahl der Tiere pro Käfig wurden die Gruppen 1 und 5 in Typ II- oder Typ III-Käfigen gehalten. Der Einstreu wurden Zellstofftücher zugesetzt. Einmal pro Woche wurden die Tiere umgesetzt und in regelmäßigen Abständen gewogen.

IV - 2.4. Futtersorten

Die Untersuchungen der Mäuse wurden in den verschiedenen Laboratorien mit verschiedenen Futtersorten durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch unter unterschiedlichen Haltungsbedingungen zu untersuchen. Im Folgenden sind die Tiergruppen den einzelnen Futtersorten zugeordnet (Mehrfachnennung bei Vergleich zweier Futtersorten innerhalb einer Tiergruppe):

- „ssniff M-Z, 10mm, autoklavierbar“ (V1124, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest/Deutschland), pelletiert; 22,0% Rohprotein, 4,5% Rohfett, 3,9% Rohfaser, 6,8% Rohasche; Brennwert vor Autoklavieren: 13,3 MJ/kg
(Gruppe 1)
- „ssniff R/M-H, 10mm, autoklavierbar“ (V1534-300, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest/Deutschland), pelletiert; 19,0% Rohprotein, 3,3% Rohfett, 4,9% Rohfaser, 6,7% Rohasche; Brennwert vor Autoklavieren: 12,2 MJ/kg; wird im Folgenden als „**pelletiertes Futter**“ bezeichnet
(Gruppe 2)
- „ssniff R/M-H, extrudiert“, (V1536-000); 20,0% Rohprotein, 3,5% Rohfett, 4,9% Rohfaser, 6,7% Rohasche; Brennwert: 12,5 MJ/kg; wird im Folgenden als „**extrudiertes Futter**“ bezeichnet
(Gruppe 2 und 3)
- „Altromin Standard-Diät Ratten – Mäuse 1324“ (Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage/Deutschland); 19,0% Rohprotein, 4,0% Rohfett, 6,0% Rohfaser, 7,0% Rohasche; Brennwert: 12,5 MJ/kg; wird im Folgenden als „**Low fat“-Futter** bezeichnet; bei diesem Futter entfallen 13,6% der umsetzbaren Energie auf den Fettanteil
(Gruppe 4 und 5)

- „Altromin Sonderdiät Ratte/Maus/Hamster C1057 fettreich“; 17,0% Rohprotein, 15,0% Rohfett, 4,0% Rohfaser, 6,0% Rohasche; Brennwert: 14,6 MJ/kg; wird im Folgenden als **„High Fat“-Futter** bezeichnet; bei diesem Futter entfallen 35,0% der umsetzbaren Energie auf den Fettanteil

(Gruppe 4)

Die Futtersorten „ssniff M-Z, 10mm, autoklavierbar“ und „ssniff R/M-H, 10mm, autoklavierbar“ sind weitgehend miteinander vergleichbar (erstes hat als Zuchtfutter einen etwas höheren Anteil an Rohprotein, Rohfett und einigen Aminosäuren sowie einen etwas erhöhten Brennwert). Besonders die Herstellung durch Pelletierung sowie die Autoklavierung vor Verfütterung führen zu einem ähnlichen Erscheinungsbild. Die „Altromin Standard-Diät Ratten – Mäuse 1324“ hat ebenfalls Ähnlichkeiten mit „ssniff R/M-H, 10mm, autoklavierbar“. Da das Altromin-Futter nicht autoklaviert wurde, ergibt sich ein etwas anderes Erscheinungsbild.

IV - 2.5. Bestimmung des Anteils von Körperfett, Muskelmasse und Extrazellulärflüssigkeit am Gesamtkörpergewicht

Diese Untersuchungen wurden an den Mäusen der **Gruppe 4** mittels Minispec MQ10 NMR Analyzer (Bruker, Billerica, Massachusetts/USA; www.minispec.com) sowie der Software von Echo Medical Systems (Houston, Texas/USA) vorgenommen. Dieses Gerät nutzt die Tatsache der verkürzten transversalen und longitudinalen Relaxationszeiten des Wasserstoffs in gebundenem Wasser. Die Relaxationszeiten unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Geweben. Als Basis dient der Wasserstoff aus in Knochen gebundenem Wasser; Fett und andere weiche Gewebe haben eine doppelt so lange Relaxationszeit, Protein (Muskulatur) eine wesentlich kürzere. Aus den Relationen der ermittelten Zeiten werden die Gewebsmengen berechnet. Die Summe der aus den NMR-Werten berechneten Massen von Körperfett, Muskelmasse und Extrazellulärflüssigkeit kann bei hohen Körperfettgehalten (>60%) vom direkt gemessenen Körpergewicht um 2–3% abweichen. Da der prozentuale Anteil der gemessenen Gewebsmengen auf das per Wägung bestimmte Gesamtkörpergewicht bezogen wurde, kann die Summe der prozentualen Gewebsmengen über 100% betragen.

IV - 2.6. Organgewichte, Blutparameter und Enzymaktivitäten

Von den Tieren der Gruppe 2 wurde zu Beginn des Versuches aus der Schwanzvene Vollblut für die Bestimmung der Glucose bzw. der freien Ketonkörper entnommen. Diese wurden mit einem Accu-Chek Comfort Blutglucosemessgerät (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/Deutschland) bzw. einem Medisense Precision Xtra Messgerät (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden/Deutschland) analysiert. Bei Versuchsende wurden die Tiere nach CO₂-Anästhesie durch Dekapitation getötet und aus dem anfallenden Blut wie oben beschrieben Glucose und Ketone bestimmt. Aus dem restlichen Blut wurde Serum gewonnen, bei –80°C gelagert und später mithilfe eines Cholestech LDX Lipidanalysators und der dazu gehörigen Testkassetten „Lipid-Profil + Glucose“ (Incomat Medizinische Geräte GmbH, Glashütten/Deutschland) Triglyceride, Gesamtcholesterol, High-density-Lipoproteine (HDL) und Very-low-density-Lipoproteine (VLDL) gemessen. Eine größere Anzahl der Gesamtcholesterol-Werte lag unterhalb des Messbereiches von min. 100 mg/dl; an dieser Stelle wurden Werte von 100 mg/dl eingesetzt. Ebenso lag eine größere Anzahl der HDL-Werte oberhalb des Messbereiches von max. 100 mg/dl; an dieser Stelle wurden ebenfalls Werte von 100 mg/dl eingesetzt. Da sich die Werte der Low-density-Lipoproteine (LDL) bei dem Cholestech-Gerät aus den Werten von HDL und Gesamtcholesterol berechnen, war eine sichere Berechnung aus den vorhandenen Werten nicht möglich.

Zusätzlich wurden den Tieren Herz, linke Niere, Milz, abdominales Fettgewebe sowie der Hypothalamus entnommen und deren Gewicht bestimmt. NEP und ACE im Hypothalamus wurden wie in Kap. III - 2.3 beschrieben untersucht. Die Bestimmung des Leptinspiegels wird gesondert beschrieben.

Nach den oben beschriebenen Methoden wurden die Tiergruppen 3 und 4 ebenfalls auf ihren Blutglucosespiegel untersucht (**Gruppe 3** im Rahmen des unten beschriebenen Glucosetoleranztests).

IV - 2.7. Leptin-Spiegel

Die Serum-Leptinspiegel der am DIfE mit High-Fat- bzw. Low-Fat-Diät gefütterten Tiere (**Gruppe 4**) wurden mithilfe der ELISA-Technik (Quantikine Maus Leptin Immunoassay Kit MOB00 von R&D Systems Inc., Minneapolis/USA) analysiert. Die Proben wurden 1:10 verdünnt; Proben deren Werte über dem Messbereich lagen, wurden 1:50 verdünnt und anschließend incl. aller Kontrollen und Standards erneut gemessen.

IV - 2.8. Oraler Glucosetoleranz-Test (OGT)

An zwei verschiedenen Tagen wurden 8 weibliche und 9 männliche Wildtypen bzw. 10 weibliche und 9 männliche Knockouttiere getestet (**Gruppe 3**). Die Tiere hatten 8 h vor dem Test keinen Zugang zum Futter. Zunächst wurden die basalen Blutglucose-Werte nach Punktion der Schwanzvene bestimmt. 30 min danach wurde den Tieren Glucose (1 mg/g Körpergewicht, gelöst in Wasser) oral appliziert und die Blutglucose-Werte 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h und 6 h danach gemessen. Da an beiden Messtagen vergleichbare Kurvenverläufe resultierten, wurden die Werte der korrespondierenden Tiergruppen gemittelt. Die Kurven wurden durch Zweifaktorielle Varianzanalyse verglichen. Die Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden mittels ungepaarten t-Tests verglichen.

IV - 2.9. Futterverbrauch

Zu zwei Zeitpunkten während des Versuchs mit der **Gruppe 2** am FEM (die Tiere waren durchschnittlich 6 bzw. 12 Monate alt) wurde das Futter auf den Rufen ein- und ausgewogen und die pro Tag konsumierten Mengen durch das Gesamtgewicht der im Käfig befindlichen Tiere geteilt. Daraus wurde ein mittlerer Futterverbrauch in g / kg Körpergewicht / d berechnet.

IV - 2.10. Energiehaushalt

Parameter des Energiestoffwechsels wurden an den Mäusen der **Gruppe 4** mithilfe der indirekten Kalorimetrie ermittelt [Aust, 01]. Dabei geht man davon aus, dass zur Bildung von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen spezifische Sauerstoffmengen benötigt werden. Aus dem Volumen von verbrauchtem Sauerstoff (V_{O_2}) und gebildetem Kohlendioxid (V_{CO_2}) kann über den Respiratorischen Quotienten (RQ, Respiratorische Austauschrate; bestimmt als Quotient aus V_{CO_2} [ml/kg Körpergewicht/h] und V_{O_2} [ml/kg Körpergewicht/h]) auf den Substanzumsatz geschlossen werden. Der RQ ist für Kohlenhydrate = 1, für Fette = 0,707 und für Proteine = 0,83 [Menke, 80]. Ein $RQ > 1$ kann dann auftreten, wenn der Kohlenhydratabbau von einer ausgeprägten Fettsynthese begleitet wird. Weiterhin wird bei der Energieumwandlung nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik ein großer Teil der Energie in Wärme umgewandelt (Angaben in kJ oder kcal), deren Abgabe über einen definierten Zeitraum (in kcal/h) verfolgt wird.

IV - 2.11. Peptidabbau durch die NEP

Die Abbaustudien mit Peptiden wurden in Analogie zu den A β -Peptiden (Kap. II - 2.2) durchgeführt. Für orientierende Versuche wurde zunächst rhNEP verwendet, für weiter gehende Versuche mit durch rhNEP abbaubaren Peptiden wurden zusätzlich sowohl aus Seminalplasma aufgereinigte NEP als auch Hirnmembran-Präparationen von NEP (–/–)- und NEP (+/+)-Mäusen verwendet. Die Peptide wurden entweder von Bachem Distribution Services GmbH (Weil am Rhein/Deutschland) oder Phoenixpeptide (Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe/Deutschland) bezogen. Die Methoden zur Mikrodialyse sind ausführlich bei Richter et al. beschrieben [Richter, 00].

IV - 2.12. Statistik allgemein

Die statistische Auswertung wurde analog zu der Beschreibung in Kap. III - 2.6 vorgenommen. Der jeweils verwendete Test und die statistischen Parameter sind in den Ergebnissen aufgeführt.

IV - 3. ERGEBNISSE

IV - 3.1. Beschreibung des Phänotyps

Im Zusammenhang mit anderen Versuchen an adulten NEP-defizienten Mäusen fiel bei diesen Tieren ein im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen häufiges Auftreten von schweren fettleibigen Tieren auf. Abb. 15 zeigt ein typisches Bild zweier gleich alter weiblicher Wildtyp- (1A links) bzw. NEP-Knockout-Tiere (1A rechts sowie 1B). Im Bauchraum sind bei diesen übergewichtigen Tieren große Fettansammlungen zu beobachten (Abb. 15C).

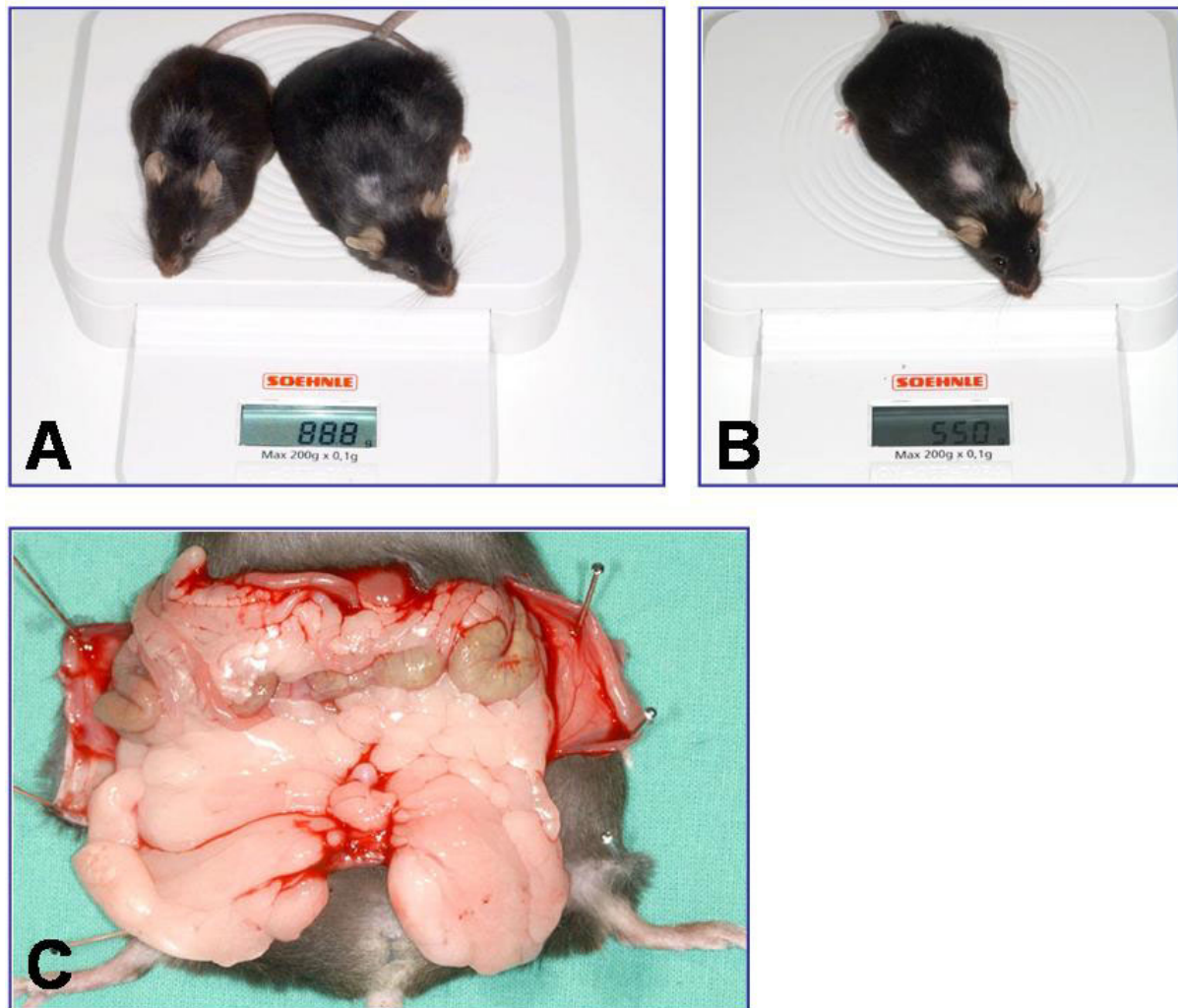


Abb. 15: A: Repräsentativer Phänotyp zweier Mäuse auf C57Bl/6-Hintergrund im Alter von 15 Monaten. Links wildtypische Maus mit 33,8 g, rechts NEP-Knockout-Maus mit 55,0 g. B und C: NEP-Knockout-Maus mit 55,0 g aus Abb. 15A auf Waage, geöffneter Bauchraum mit großen Fettansammlungen.

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um Einzelercheinungen oder einen allgemeinen Phänotyp handelt, wurden über einen langen Zeitraum die Körpergewichte aller verfügbaren NEP-Knockout-Tiere und entsprechender wildtypischer Kontrollmäuse gemessen (**Gruppe 1**). Die Knockouttiere wiesen, verglichen mit den Kontrollen, ungefähr ab dem 2. Lebensdrittel ein höheres mittleres Körpergewicht auf (Tab. 7).

Tab. 7: Mittelwerte des Körpergewichts von NEP(+/-)- und (-/-)-Tieren (Gruppe 1).

	Mittelwert \pm SEM (+/-)	N	Mittelwert \pm SEM (-/-)	N	Signifikanz
Männchen 5.-9. Monat	34,32 \pm 0,24 g	187	33,45 \pm 0,17 g	743	***
Weibchen 4.-8. Monat	26,17 \pm 0,16 g	264	27,24 \pm 0,18 g	445	***
Männchen 10. Monat bis Tod	36,31 \pm 0,24 g	330	39,65 \pm 0,23 g	999	***
Weibchen 9. Monat bis Tod	29,72 \pm 0,29 g	329	37,13 \pm 0,32 g	726	***

N = Zahl der einzelnen Messwerte; ***: $P < 0,0001$.

Zwar unterscheiden sich auch die Gewichte der jungen Tiergruppen statistisch signifikant, dies liegt aber an der sehr großen Zahl ausgewerteter Gewichtsdaten. Die Gewichtsdiﬀerenzen der jüngeren Tiergruppen (Männchen: 0,87 g, Weibchen: 1,07 g) fallen wesentlich geringer aus als bei den älteren Tiergruppen (Männchen: 3,34 g, Weibchen: 7,41 g) und sind wahrscheinlich physiologisch nicht relevant.

Wenn nicht die Mittelwerte, sondern die einzelnen Messwerte in einer Graphik aufgetragen werden, wird auch ersichtlich, warum sich trotz des beträchtlichen Übergewichtes vieler Knockout-Mäuse die Mittelwerte erst relativ spät auseinander entwickeln. Abb. 16 zeigt, dass die einzelnen Körpergewichte der NEP-Knockout-Tiere über einen wesentlich größeren Bereich streuen, als ihre wildtypischen Kontrollen.

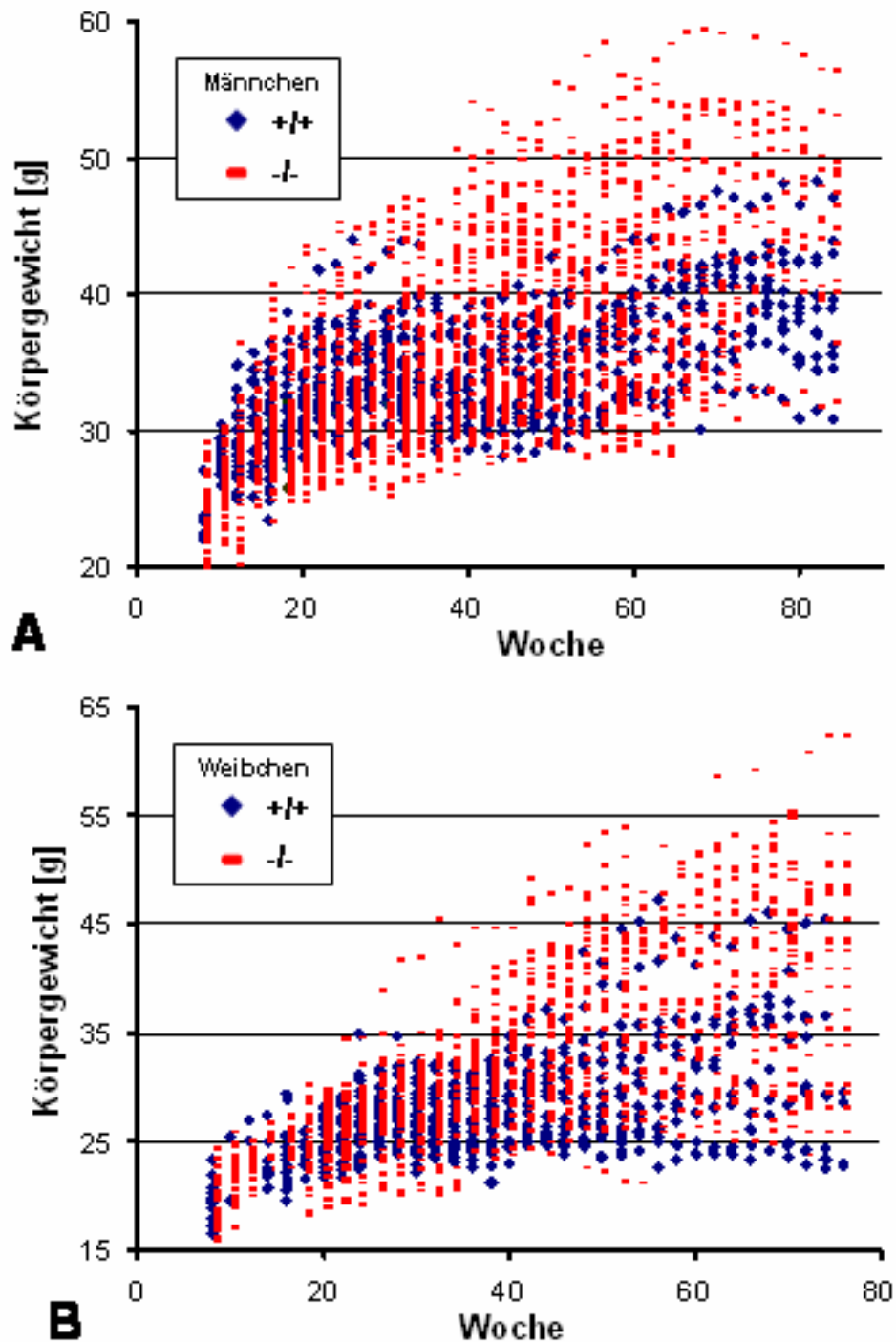


Abb. 16: Einzelwerte der Körpergewichte von Gruppe 1. (A) Männchen (2096 Datenpunkte bei NEP (–/–), 642 Datenpunkte bei NEP (+/+)), **(B) Weibchen** (1236 Datenpunkte bei NEP (–/–), 614 Datenpunkte bei NEP (+/+)).

Als Ursache für die Streuung der Tiergewichte innerhalb der Gruppen wurden verschiedene Parameter vermutet, vor allem Haltungsbedingungen wie die Käfigbelegung, Käfigausstattung, Raumbellegung oder verschiedene Futtersorten. Bei der Käfigbelegung wurde in einer retrospektiven Auswertung der oben genannten Daten gefunden, dass die für Typ II-Käfige normale Belegung von 2-5 Tieren wenig

unterschiedliche Gewichtskurven-Verläufe brachte. Die Zugabe von 1-2 ungefärbten und ungebleichten Papiertüchern erwies sich durchweg als positiv und wurde seit dem in allen Tierversuchen angewandt [s. auch Koolhaas, 97]. Einen mindestens ebenso großen Einfluss hatten die räumlichen Gegebenheiten. Die Untersuchungen wurden in mehreren Tierräumen in den Versuchstierhaltungen dreier unterschiedlicher Institute durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass in gering belegten Tierräumen mit einer niedrigen Frequenz von störenden Einflüssen – vor allem einer geringen Tierbelegung und daraus resultierend seltenerem Füttern und Tränken – die Gewichtsdivergenz zwischen Wildtypen und Knockouttieren deutlich zunahm. Zwar legten auch die Kontroll-Tiere an Gewicht zu, die Zunahme fiel jedoch bei den Knockouttieren stärker aus.

Den stärksten Einfluss auf die Auseinanderentwicklung der Gewichte, hatte allerdings die Wahl der Futtersorte. Die Tiere wurden in den unterschiedlichen Laboratorien zunächst mit verschiedenen Futtersorten versorgt. Alle diese Sorten hatten vergleichbare, nur minimal von einander abweichende Zusammensetzungen, wie im Methodenteil aufgelistet. Wesentliche Unterschiede lagen jedoch in der Art der Herstellung und der weiteren Aufbereitung vor der Verfütterung. Es wurde entweder pelletiertes oder extrudiertes Futter verwendet. In einem der Tierlabore wurde das pelletierte Futter wiederum erst nach Autoklavierung verfüttert, um in diesem Raum eine Keimreduzierung zu erreichen.

IV - 3.2. Vergleich von pelletiertem und extrudiertem Futter (Gruppe 2)

IV - 3.2.1. Gewichtsentwicklung

Zur näheren Charakterisierung der letztgenannten Beobachtungen wurde ein Versuch konzipiert, in dem der Effekt von pelletiertem und extrudiertem Futter auf die Gewichtsentwicklung beider Genotypen untersucht werden sollte. Dafür wurde wöchentlich von der 7. bis zur 67. Lebenswoche das Körpergewicht von wildtypischen sowie NEP-defizienten Tieren ermittelt, die entweder pelletiertes oder extrudiertes Futter bekamen. 15 Männchen NEP (+/+), 20 Männchen NEP (-/-), 8 Weibchen NEP (+/+) und 18 Weibchen NEP (-/-) wurden mit pelletiertem Futter gefüttert sowie 14 Männchen NEP (+/+), 19 Männchen NEP (-/-), 10 Weibchen

NEP (+/+) und 20 Weibchen NEP (-/-) mit extrudiertem Futter (Anzahlen zu Beginn des Versuches; während des Versuches gestorbene Tiere wurden nicht ersetzt). Wie in Abb. 17 zu sehen, setzt bei den mit extrudiertem Futter gefütterten Männchen die Auseinanderentwicklung relativ früh ein. Bei den restlichen Gruppen sind auch in diesem Versuch deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout erst später zu beobachten, z. B. bei den Weibchen mit extrudiertem Futter nach dem 10. Monat. Bei den Tieren, die mit pelletiertem/autoklaviertem Futter gefüttert wurden entwickelten sich dagegen kaum Unterschiede.

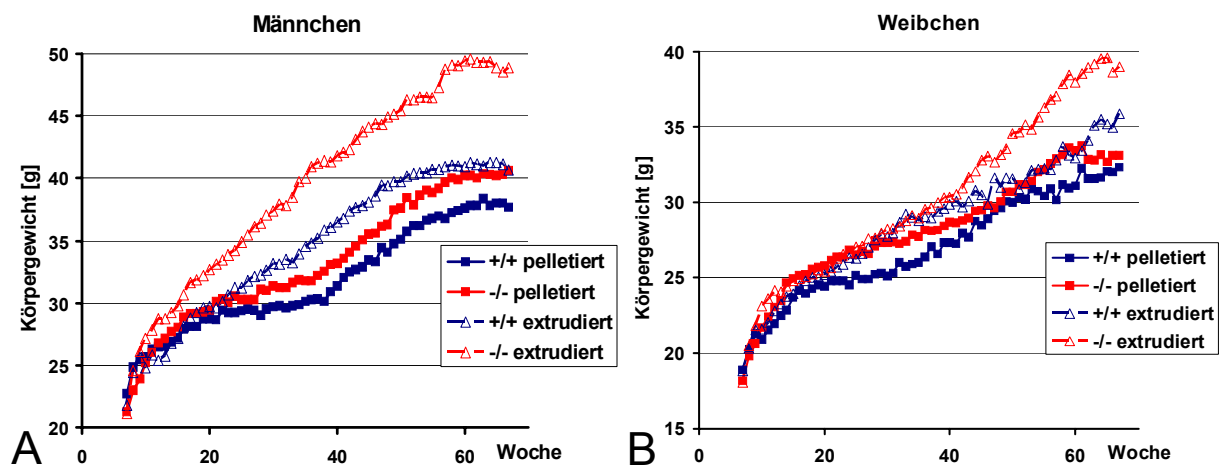


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf des Körpergewichtes bei den Tieren der Gruppe 2.

Die Gewichtskurven wurden im Zeitraum der 17.-64. Woche durch Dreifaktorielle Varianzanalyse mit wiederholten Messungen (Alter x Genotyp x Futter) nach Wilks-Lambda verglichen.

A (Männchen): $P = 0,01$. N (Anzahl der Tiere): Pelletiertes Futter: 14 (+/+), 18 (-/-) ; Extrudiertes Futter: 14 (+/+), 16 (-/-).

B (Weibchen): P konnte aufgrund ungenügender Residuen-Freiheitsgrade nicht berechnet werden (weitere statistische Auswertungen siehe Tab. 8). N (Anzahl der Tiere): Pelletiertes Futter: 8 (+/+), 17 (-/-) ; Extrudiertes Futter: 7 (+/+), 19 (-/-).

Die statistische Auswertung der verschiedenen Gruppen gegeneinander ist in Tab. 8 dargestellt (s. folgende Seite).

IV - 3.2.2. Organgewichte

Die Gewichte verschiedener Organe können durch das Körpergewicht, besonders durch das Körperfett sowie Blutfettwerte, beeinflusst werden. Ein auffälliger Trend unserer Messungen zeigte sich beim abdominalen Fettgewebe. In Analogie zu ihrem Körpergewicht waren auch die Fettpolster der mit extrudiertem Futter gefütterten Tiere schwerer als bei den Tieren des gleichen Genotyps unter pelletiertem Futter (siehe die korrespondierenden Genotypen in Tab. 9, s. S. 108). Ebenso zeigte sich

Tab. 8: Statistischer Vergleich der Untergruppen aus dem Futtermittelvergleich (Gruppe 2).

A. Zweifaktorielle Varianzanalyse der einzelnen Untergruppen der Gruppe 2 über den <u>gesamten Zeitraum</u>*				
Verglichene Untergruppen	Mittelwerte \pmSEM (gesamter Zeitraum)		Differenz	Sign.
	Untergruppe 1	Untergruppe 2		
<u>Männchen</u>				
(+/+) pelletiert vs. (+/+) extrudiert	32,79 \pm 1,12 g	36,15 \pm 1,12 g	3,36 g	★
(-/-) pelletiert vs. (-/-) extrudiert	34,71 \pm 0,99 g	41,89 \pm 1,05 g	7,18 g	★★★
(+/+) pelletiert vs. (-/-) pelletiert	32,79 \pm 1,12 g	34,71 \pm 0,99 g	1,92 g	n.s.
(+/+) extrudiert vs. (-/-) extrudiert	36,15 \pm 1,12 g	41,89 \pm 1,05 g	5,74 g	★★
<u>Weibchen</u>				
(+/+) pelletiert vs. (+/+) extrudiert	27,77 \pm 0,93 g	29,82 \pm 1,00 g	2,05 g	n.s.
(-/-) pelletiert vs. (-/-) extrudiert	28,87 \pm 0,64 g	31,52 \pm 0,61 g	2,65 g	★★
(+/+) pelletiert vs. (-/-) pelletiert	27,77 \pm 0,93 g	28,87 \pm 0,64 g	1,10 g	n.s.
(+/+) extrudiert vs. (-/-) extrudiert	29,82 \pm 1,00 g	31,52 \pm 0,61 g	1,70 g	n.s.

B. Vergleich der Gruppen während der <u>letzten 10 Wochen</u> (t-Test)				
Verglichene Gruppen	Mittelwerte \pmSEM (Wochen 58-67)		Differenz	Sign.
	Gruppe 1	Gruppe 2		
<u>Männchen</u>				
(+/+) pelletiert vs. (+/+) extrudiert	37,77 \pm 0,10 g	41,07 \pm 0,06 g	3,30 g	★★★
(-/-) pelletiert vs. (-/-) extrudiert	40,23 \pm 0,07 g	49,14 \pm 0,10 g	8,91 g	★★★
(+/+) pelletiert vs. (-/-) pelletiert	37,77 \pm 0,10 g	40,23 \pm 0,07 g	2,46 g	★★★
(+/+) extrudiert vs. (-/-) extrudiert	41,07 \pm 0,06 g	49,14 \pm 0,10 g	8,07 g	★★★
<u>Weibchen</u>				
(+/+) pelletiert vs. (+/+) extrudiert	31,67 \pm 0,16 g	33,17 \pm 0,11 g	1,50 g	★★★
(-/-) pelletiert vs. (-/-) extrudiert	34,40 \pm 0,34 g	38,76 \pm 0,19 g	4,36 g	★★★
(+/+) pelletiert vs. (-/-) pelletiert	31,67 \pm 0,16 g	34,40 \pm 0,34 g	2,73 g	★★★
(+/+) extrudiert vs. (-/-) extrudiert	33,17 \pm 0,11 g	38,76 \pm 0,19 g	5,59 g	★★★

Im oberen Teil der Tabelle (A) sind die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen über den gesamten Zeitraum sowie deren Differenzen dargestellt (* um Gruppen mit konstanter Tieranzahl zu erhalten wurde der Zeitraum 17.-64. Woche ausgewertet). Die Gewichtskurven der einzelnen Gruppen wurden mittels Zweifaktorieller Varianzanalyse mit wiederholten Messungen (Alter x Genotyp bzw. Alter x Futter) verglichen.

Im unteren Teil der Tabelle (B) sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen während der letzten 10 Wochen sowie deren Differenzen bei direktem Vergleich mittels t-Test aufgeführt. In dieser Zeit erreichten die meisten Gruppen eine Phase relativer Gewichtskonstanz (Plateauphase). n.s.: $P > 0,05$; ★: $P \leq 0,05$; ★★: $P \leq 0,01$; ★★★: $P \leq 0,001$

beim Vergleich der Genotypen gegeneinander eine Parallelität der Fettmengen zum Körpergewicht: Während unter pelletiertem Futter keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout und Wildtyp auftraten, war die Fettmasse der NEP-Knockout-Tiere unter extrudiertem Futter erhöht (jedoch bei den Männchen ohne statistische Signifikanz). Beim Gewicht von Herz, Niere und Milz zeigte sich dagegen kein solcher Trend. Bei der Milz der Weibchen NEP (+/+) (Extrudiertes Futter) konnte nur von einem Tier ein Wert erfasst werden. Da dieses Tier offensichtlich eine krankhaft vergrößerte Milz hatte, resultiert hier ein extrem hoher Wert.

IV - 3.2.3. Diverse Parameter aus Blut bzw. Serum

Zu Versuchbeginn wurden bei durchschnittlich 7 Wochen alten Tieren die Glucose- und Ketonwerte gemessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den korrespondierenden Genotyp-Gruppen. Auch am Versuchsende waren keine Unterschiede bei diesen Parametern auszumachen.

Bei den biochemischen Parametern, die eine wichtige Rolle beim Fettstoffwechsel spielen (wie z.B. Lipoproteine und Triglyceride) wurden zwischen den Genotypen (innerhalb der jeweiligen Futter- und Geschlechtsgruppe) einige signifikante Unterschiede beobachtet. Diese zeigten jedoch nicht durchgängig bei *beiden* Futtersorten und bei *beiden* Geschlechtern die gleiche Tendenz. Häufig waren aber die Werte in beiden Futtergruppen ähnlich groß. Deshalb wurden zusätzlich zu der futterspezifischen Auswertung (siehe Tab. 9) auch die über beide Futtergruppen gemittelten Werte analysiert (nicht in der Tabelle abgebildet). Bei dieser Auswertung wurde das Ergebnis mit der deutlichsten Tendenz beim Gesamtcholesterol beobachtet: Die Mittelwerte der jeweiligen Knockout-Gruppe lagen immer unter denen der korrespondierenden Kontrollgruppe. Signifikant waren die Unterschiede jeweils bei Männchen ($P < 0,05$) und Weibchen ($P < 0,01$) in den über beide Futtersorten gemittelten Gruppen:

Weibchen: NEP [+/+]: $115,3 \pm 3,6$ mg/dl, N=16 vs. NEP [-/-]: $104,3 \pm 1,4$ mg/dl, N=35,

Männchen: NEP [+/+]: $152,4 \pm 7,4$ mg/dl, N=28 vs. NEP [-/-]: $129,9 \pm 7,0$ mg/dl, N=34.

Eine Mittelung der Werte von Männchen und Weibchen wurde nicht vorgenommen. Zwar wiesen diese oft die gleiche Tendenz auf; da die *absoluten* Werte aber meist stark differierten, wurde die Auswertung auch hier geschlechtsspezifisch vorgenommen.

Tab. 9: Organgewichte und diverse Blutparameter der Tiere aus Gruppe 2.

	Para- meter	PELLET. FUTTER				EXTRUD. FUTTER			
		♀ (+/+)		Sig.		♀ (-/-)		Sig.	
		Mittel	SEM			Mittel	SEM		
7. Woche	Glucose	128,9	2,2	8	n.s.	128,0	0,8	18	n.s.
	Ketone	0,375	0,013	8	n.s.	0,383	0,010	18	n.s.
nach Tötung	Glucose	122,2	2,7	8	n.s.	116,6	1,3	17	n.s.
	Ketone	0,388	0,021	8	n.s.	0,300	0,007	17	n.s.
	Triglyce- ride	133,9	3,0	8	n.s.	125,4	1,9	17	n.s.
	Gesamt- Chol.	117,1	1,6	8	★ ★ ★	102,1	0,3	17	n.s.
	HDL	79,6	2,8	8	★	62,2	1,0	17	n.s.
	VLDL	26,5	0,6	8	n.s.	25,2	0,4	17	n.s.
	Fettmasse	1,01	0,07	8	★	0,64	0,01	16	★
	Niere	0,187	0,004	8	★	0,219	0,002	17	n.s.
	Herz	0,107	0,002	8	n.s.	0,103	0,001	17	n.s.
	Milz	0,154	0,016	2	n.s.	0,120	0,006	5	n.s.

	Para- meter	PELLET. FUTTER				EXTRUD. FUTTER			
		♂ (+/+)		Sig.		♂ (-/-)		Sig.	
		Mittel	SEM			Mittel	SEM		
7. Woche	Glucose	137,7	1,3	15	n.s.	149,1	1,5	20	n.s.
	Ketone	0,353	0,009	15	n.s.	0,340	0,010	20	n.s.
nach Tötung	Glucose	130,9	3,2	8	n.s.	134,2	1,3	18	n.s.
	Ketone	0,364	0,010	14	n.s.	0,278	0,007	18	n.s.
	Triglyce- ride	170,0	3,6	14	n.s.	154,7	2,5	18	★
	Gesamt- Chol.	145,9	2,3	14	n.s.	129,9	2,8	18	★
	HDL	91,3	1,4	14	n.s.	87,8	0,7	18	n.s.
	VLDL	34,1	0,7	14	n.s.	31,0	0,5	18	★
	Fettmasse	0,95	0,03	14	n.s.	0,99	0,02	18	n.s.
	Niere	0,249	0,003	14	n.s.	0,248	0,002	18	n.s.
	Herz	0,138	0,001	14	n.s.	0,126	0,001	18	n.s.
	Milz	0,084	0,003	7	★	0,113	0,003	8	★ ★

Organgewichte und diverse Parameter aus Blut/Serum der Weibchen (A) bzw. Männchen (B) aus Gruppe 2.

Organgewichte sind in [g] angegeben, Ketonwerte in [mmol/l], die restlichen Blutwerte in [mg/dl]. Die Auswertung erfolgte für jedes Paar Wildtyp/Knockout getrennt mittels t-Test. Mit farbigem Rahmen hervorgehoben sind Parameter, bei denen im Vergleich zwischen den Genotypen eine ähnliche Tendenz bei beiden Geschlechtern und z. T. auch bei beiden Futtersorten erkennbar ist. Diese Tendenz ist nicht in jedem Falls statistisch nachweisbar. Andererseits sind statistisch signifikante Unterschiede nicht hervorgehoben, bei denen keine Analogie bei den Geschlechtern oder Futtersorten erkennbar war. n.s.: $P > 0,05$; ★: $P \leq 0,05$; ★★: $P \leq 0,01$; ★★★: $P \leq 0,001$

Bei Vergleich der Werte innerhalb einer spezifischen Futtergruppe war beim Gesamtcholesterol und beim HDL eine Tendenz der NEP-Knockout-Mäuse zu erniedrigten Werten erkennbar. Beim Gesamtcholesterol waren die Differenzen bei den Männchen in der Gruppe mit extrudiertem Futter und bei den Weibchen in der Gruppe mit pelletiertem Futter signifikant. Auch die Triglyceride hatten zum überwiegenden Teil eine Tendenz zu niedrigeren Werten bei den Knockouttieren. Die einzige signifikante Differenz bei den Triglyceriden wurde allerdings bei den erhöhten Werten der Männchen (–/–) (extrudiertes Futter) gefunden. *Generell erhöhte* Blutfettwerte bei den NEP-Knockout-Tieren können jedoch entgegen unserer Erwartung ausgeschlossen werden.

IV - 3.3. Behandlung mit fettreicher und fettarmer Diät (Gruppe 4)

In diesem Versuch wurde die Entwicklung der Körperzusammensetzung (Fettmasse, Muskelmasse, freie Körperflüssigkeit) unter dem Einfluss von fettreichem und fettarmem Futter über mehrere Monate untersucht. Dazu wurden NEP-Knockout-Weibchen mit ihren wildtypischen Kontrollen verglichen. Dieser Versuch wurde durch ein differenziertes Fütterungsregime unterlegt: Beide Gruppen erhielten entweder Standardfutter („Low Fat“) oder Nahrung mit stark erhöhtem Fettanteil („High Fat“). Im Anschluss an diesen Beobachtungszeitraum wurden die Tiere hinsichtlich ihres Respiratorischen Quotienten, des BMI sowie der Leptinkonzentration im Serum untersucht.

IV - 3.3.1. Anteil von Körperfett, Muskelmasse und Extrazellulärflüssigkeit am Gesamtkörpergewicht

Durch NMR-Analyse wurde die Körperzusammensetzung, getrennt nach Fettmasse, überwiegend proteinhaltigem Gewebe (hier kurz Muskelmasse genannt) und freier Körperflüssigkeit, am lebenden Tier über ca. 8 Monate verfolgt. Alle vier Gruppen (2 Genotypen x 2 Futtersorten) gingen im Alter von durchschnittlich 23 Wochen (Variation \pm 2 Wochen) ohne signifikante Unterschiede hinsichtlich Körpergewicht, Fettmasse, Muskelmasse sowie freier Körperflüssigkeit (nach Monofaktorieller Varianzanalyse) in den Versuch. Wie schon im Versuch mit pelletiertem und extrudiertem Futter (Abb. 17) beobachtet, entwickeln die NEP-defizienten Tiere auch

unter diesem Fütterungsregime ein höheres Körpergewicht, und auch hier treten die Differenzen zeitlich verzögert (hier: ab ca. dem 6. Lebensmonat) ein (Abb. 18). Wie zu erwarten, hatten die mit fettreicher Nahrung gefütterten Tiere ein höheres Körpergewicht als die Tiere unter Standarddiät.

Abb. 18 zeigt, dass beim Körpergewicht – wie erwartet – die Wildtypen unter Low-Fat-Futter den flachsten Kurvenverlauf haben und die Knockouttiere unter High-Fat-Futter den steilsten. In der Reihenfolge der verbleibenden zwei Gruppen lag die Gruppe [NEP (+/+) / High Fat] über der Gruppe [NEP (–/–) / Low Fat]. Dieses Ergebnis kann in Analogie zum Versuch mit pelletiertem vs. extrudiertem Futter gesehen werden (Gruppe 2), wo die Wildtypen mit dem besser verstoffwechselbaren Futter ebenfalls über den Knockout-Mäusen mit Standardfutter lagen.

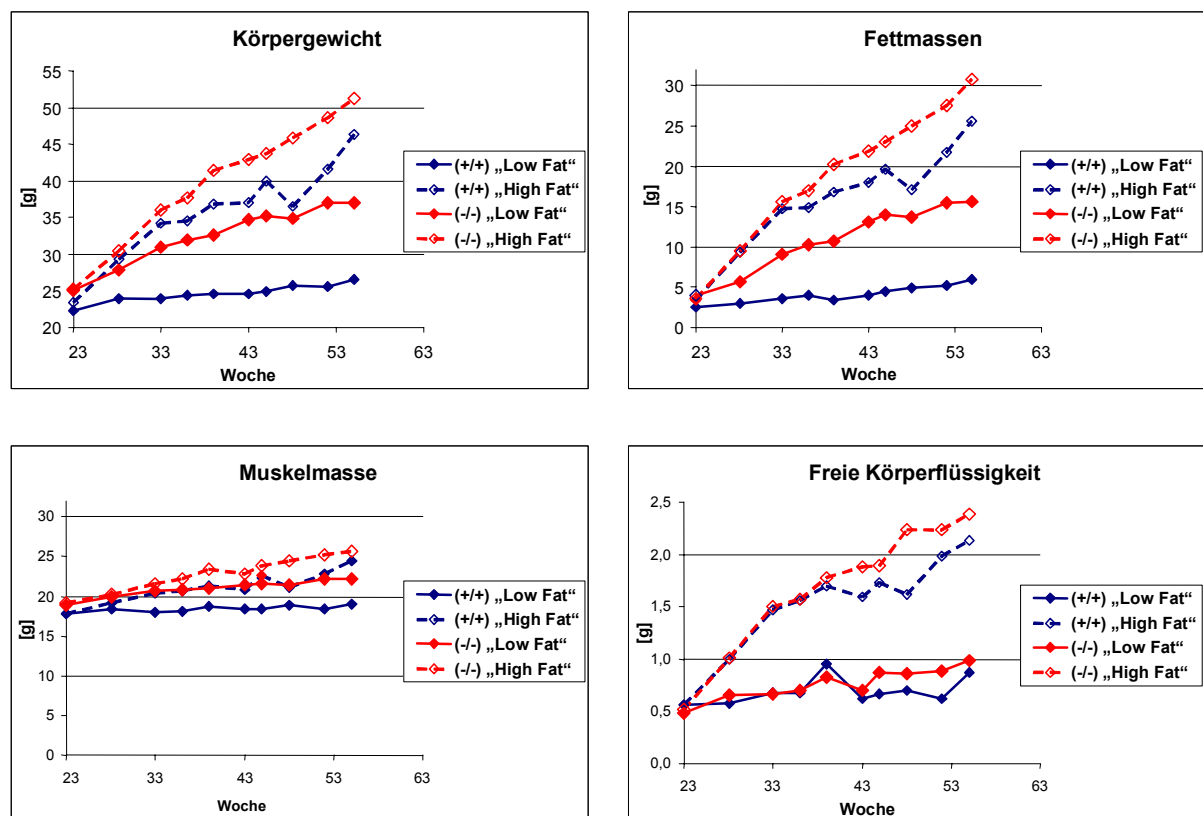


Abb. 18: Zeitliche Entwicklung von Körper-, Fett- und Muskelmasse sowie freier Körperflüssigkeit bei den Tieren der Gruppe 4.

Die Kurven wurden durch Zweifaktorielle Varianzanalyse (Alter x Genotyp bzw. Alter x Futter) verglichen. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Teilabbildungen „Körpergewicht“, „Fettmassen“ und „Muskelmasse“ mit derselben Spreizung der Ordinate gezeichnet. Die P-Werte waren bei fast allen verglichenen Kurvenpaaren signifikant (mit $P < 0,05$, zumeist sogar $P < 0,001$). Lediglich beim Vergleich der freien Körperflüssigkeit zwischen (+/+) und (–/–) in der Low-fat-Gruppe unterschieden sich die Kurvenverläufe nicht signifikant. Anzahl der Tiere zu Beginn der Untersuchung (N):

Low-fat-Futter: 4 (+/+), 11 (–/–) ; High-fat-Futter: 6 (+/+), 12 (–/–).

Die Abb. 18 zeigt auch, dass das höhere Körpergewicht in den schwereren Tiergruppen vor allem auf eine Zunahme der Fettmassen zurückzuführen ist, während die Muskelmasse in weit geringerem Maße zunimmt. Die freie Körperflüssigkeit wird im Gegensatz zur Fettmasse kaum durch den Genotyp beeinflusst (auch wenn sich die Kurven beim Vergleich $[+/-]$ vs. $[-/-]$ beim High-fat-Futter signifikant unterscheiden) – sie steigt dagegen bei beiden Genotypen deutlich beim Einsatz von Low-fat-Futter an.

IV - 3.3.2. Prozentualer Anteil am Körpergewicht

Dass die Erhöhung des Körpergewichts vor allem auf die vermehrten Fettansammlungen und nicht auf eine Zunahme der Muskelmasse zurückzuführen ist, wird durch Abb. 19 verdeutlicht. In der Teilabbildung „Verhältnis Fettmasse / Körpergewicht“ ist der prozentuale Fettanteil am Gesamtkörpergewicht im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die überdurchschnittliche Zunahme des Fettanteils ist, wie zu erwarten, besonders bei den mit High-fat-Diät gefütterten Gruppen sichtbar: Der Anteil des Fettgewebes nimmt bei der NEP- $(-/-)$ -High-Fat-Gruppe zu Versuchsende sogar rund 60% des gesamten Körpergewichtes ein. Wichtiger jedoch für den Zusammenhang zur NEP ist der deutlich erhöhte Fettanteil bei den NEP-Knockout-Tieren im Vergleich mit den Wildtypen der *gleichen* Futtergruppe. Dieser Unterschied kann sogar besonders deutlich bei den lediglich mit Low-fat-Diät gefütterten Tieren beobachtet werden. Dort beträgt die Differenz zu den Wildtypen zu Versuchsende ca. 20%.

Die Teilabbildung „Verhältnis Muskelmasse / Körpergewicht“ veranschaulicht den prozentualen Anteil der Muskelmasse am Gesamtkörpergewicht im gleichen Zeitraum. Auch hier wird klar ersichtlich, dass der Anstieg des Körpergewichts kaum auf einer Zunahme der Muskelmasse beruht. Auch wenn die absolute Muskelmasse in allen Gruppen leicht ansteigt (Abb. 18), sinkt ihr Anteil am Gesamtkörpergewicht in derselben Abstufung zwischen den einzelnen Gruppen, wie er bei den Fettmassen zunimmt.

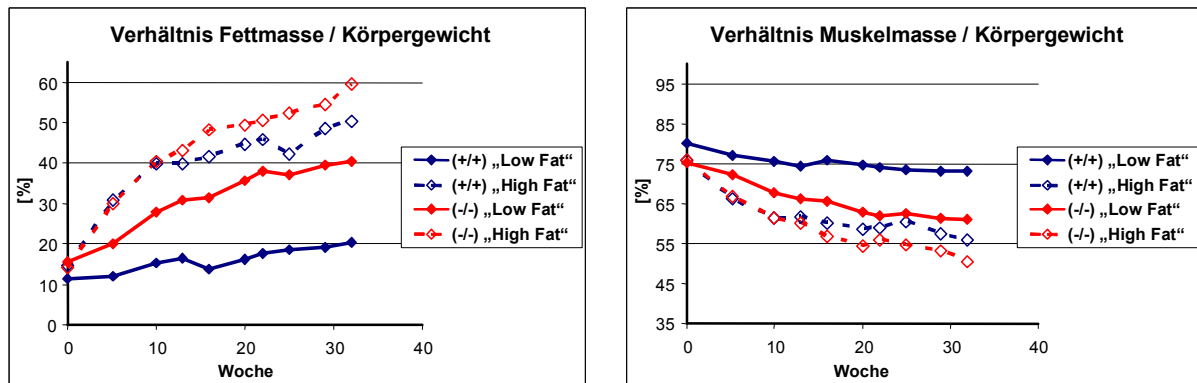


Abb. 19: Zeitliche Entwicklung der prozentualen Relation von Fett- bzw. Muskelmasse zur Gesamtmasse bei den Tieren der Gruppe 4.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Ordinaten mit derselben Spreizung gezeichnet. Die P-Werte waren bei fast allen verglichenen Kurvenpaaren signifikant (mit $P < 0,05$, zumeist sogar $P < 0,001$). Lediglich beim Vergleich des prozentualen Anteils der Muskelmasse zwischen (+/+) und (-/-) in der High-fat-Gruppe unterschieden sich die Kurvenverläufe nicht signifikant. Die übrigen Angaben zur Statistik sind der Abb. 18 zu entnehmen.

IV - 3.3.3. Leptinspiegel (Gruppe 4)

Die Leptinkonzentrationen im Serum der untersuchten Tiere wurde wegen der geringen Tierzahl der Wildtypen zu Versuchsende nicht nach den unterschiedlichen Futtersorten getrennt ausgewertet. Beide Genotypen zeigten eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen Körpergewicht, was sich bei den NEP [-/-] in einem hohen Korrelationskoeffizienten ausdrückte (0,92). Korrelations- und Regressionsanalyse war bei den wildtypischen Tieren wegen der geringen Tierzahl ($N = 4$) nicht möglich; aus dem gleichen Grund konnten die Kurven der beiden Genotypen auch nicht statistisch gegeneinander verglichen werden. Bis auf einen Wert folgen jedoch die Werte der Wildtypen dem Kurvenverlauf der Knockouttiere. Ein Anhaltspunkt für *erhöhte* Leptinwerte bei den NEP-Knockout-Mäusen, wie sie für einen übergewichtigen Tierstamm häufig beschrieben werden [Wallenius, 05], findet sich jedenfalls nicht. Wenn also die Regressionsgerade der NEP-Knockout- im Gegensatz zu den Wildtypen erniedrigt ist, müssten die NEP [-/-] bei gleichem Körpergewicht einen erniedrigten Leptinspiegel haben. Die Bedeutung für den Zusammenhang NEP-Körpergewicht kann daraus jedoch noch nicht abgeleitet werden, zumal dieses Ergebnis wegen der geringen Anzahl an Tieren in der Gruppe NEP [+/+] nicht sehr robust ist. Außerdem scheint die Verteilung der NEP [-/-] eher

einem sigmoidalen Verlauf zu folgen, der mit der Geraden der NEP [+/+] statistisch kaum verglichen werden kann.

Ein Vergleich der *Mittelwerte* beider Genotypen erschien wegen der sehr starken Streuung der Werte (von ca. 4 ng/ml bis ca. 400 ng/ml) als nicht sinnvoll.

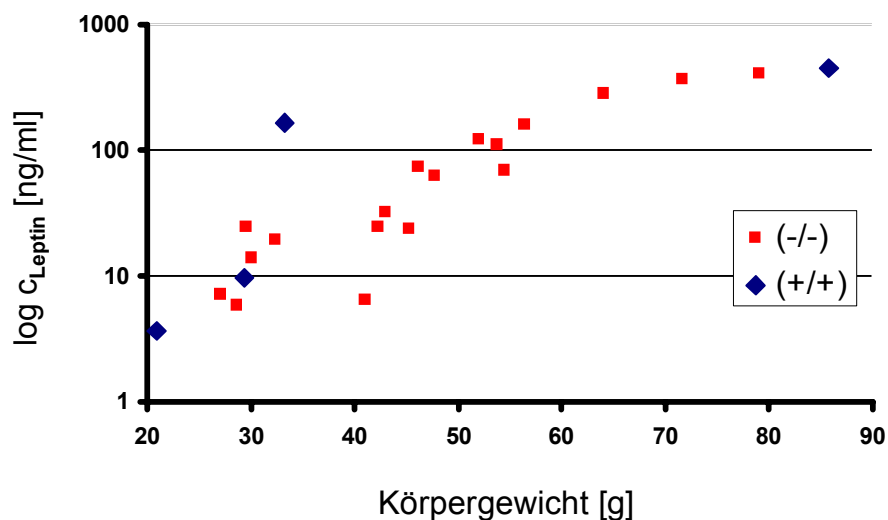


Abb. 20: Korrelation der Leptinwerte (aus den Seren von Gruppe 2) mit dem Körpergewicht

IV - 3.4. Oraler Glucosetoleranz-Test (OGT)

Ein weiterer Grund für das erhöhte Körpergewicht der NEP-Knockout-Tiere könnte in einer verschlechterten Glucoseaufnahme aus dem Blutkreislauf in die Zellen liegen. Obwohl, wie oben beschrieben, kein eindeutiger Hinweis auf unterschiedliche Glucosekonzentrationen bei freiem Zugang zum Futter gibt, sollte der Blutglucose-Verlauf nun unter kontrollierten Bedingungen verfolgt werden: Nach oraler Glucoseapplikation zeigte die Blutglucose-Kurve der NEP-defizienten Mäuse bei beiden Geschlechtern signifikant höhere Werte als bei den wildtypischen (Zweifaktorielle Varianzanalyse, $P < 0,0001$; s. Abb. 21). Bei Vergleich der Konzentrationen zum jeweiligen Zeitpunkt mittels t-Test gab es zu fast allen Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Glucosekonzentration bei den Knockouttieren. Lediglich 10 min nach oraler Applikation war der Glucosespiegel der Knockout-Weibchen gegenüber den Wildtyp-Weibchen (nicht signifikant) erniedrigt, was auf eine verzögerte Resorption der Glucose in den Knockout-Mäusen hinweisen könnte.

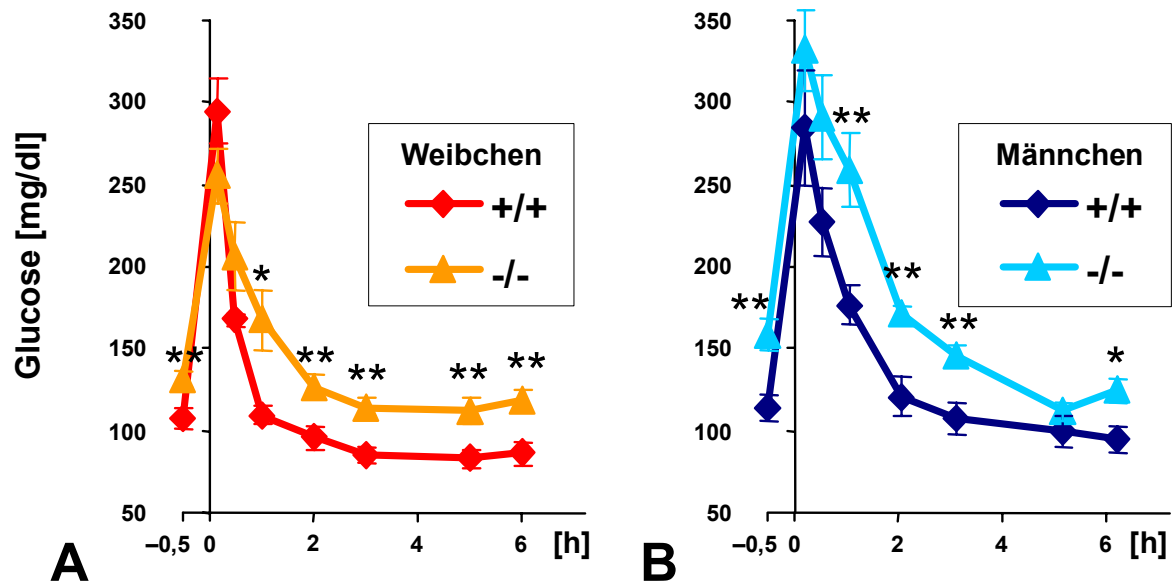


Abb. 21: Oraler Glucosetoleranztest (OGT): Blutglucose-Konzentration 30 min sowie 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h und 6 h nach oraler Glucoseapplikation in (A) Weibchen und (B) Männchen.

Die Zweifaktorielle Varianzanalyse ergab für beide Kurvenvergleiche P-Werte < 0,0001. Die Werte zu den einzelnen Zeitpunkten wurden mittels t-Test verglichen (*: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$).

IV - 3.5. Futterverbrauch (Gruppe 2)

Ein nahe liegender Grund für das erhöhte Körpergewicht und die vermehrten Fettmassen bei den NEP-Knockout-Tieren könnte ein erhöhter Futterverbrauch sein. Zur Klärung dieser Frage wurde während jeweils zweier Wochen im 6. bzw. 12. Lebensmonat der Tiere aus Gruppe 2 der Futterverbrauch ermittelt. Trotz einer Tendenz zu erhöhtem Futterverbrauch bei den NEP (-/-)-Weibchen war ein allgemeiner Trend nicht nachweisbar. Auch bei Zusammenfassung der Werte von Männchen und Weibchen bzw. von pelletiertem und extrudiertem Futter wurden keine signifikanten Differenzen beobachtet. In diesem Versuch wurden demnach keine sicheren Hinweise auf einen veränderten Futterverbrauch der NEP-Knockout-Mäusen beobachtet.

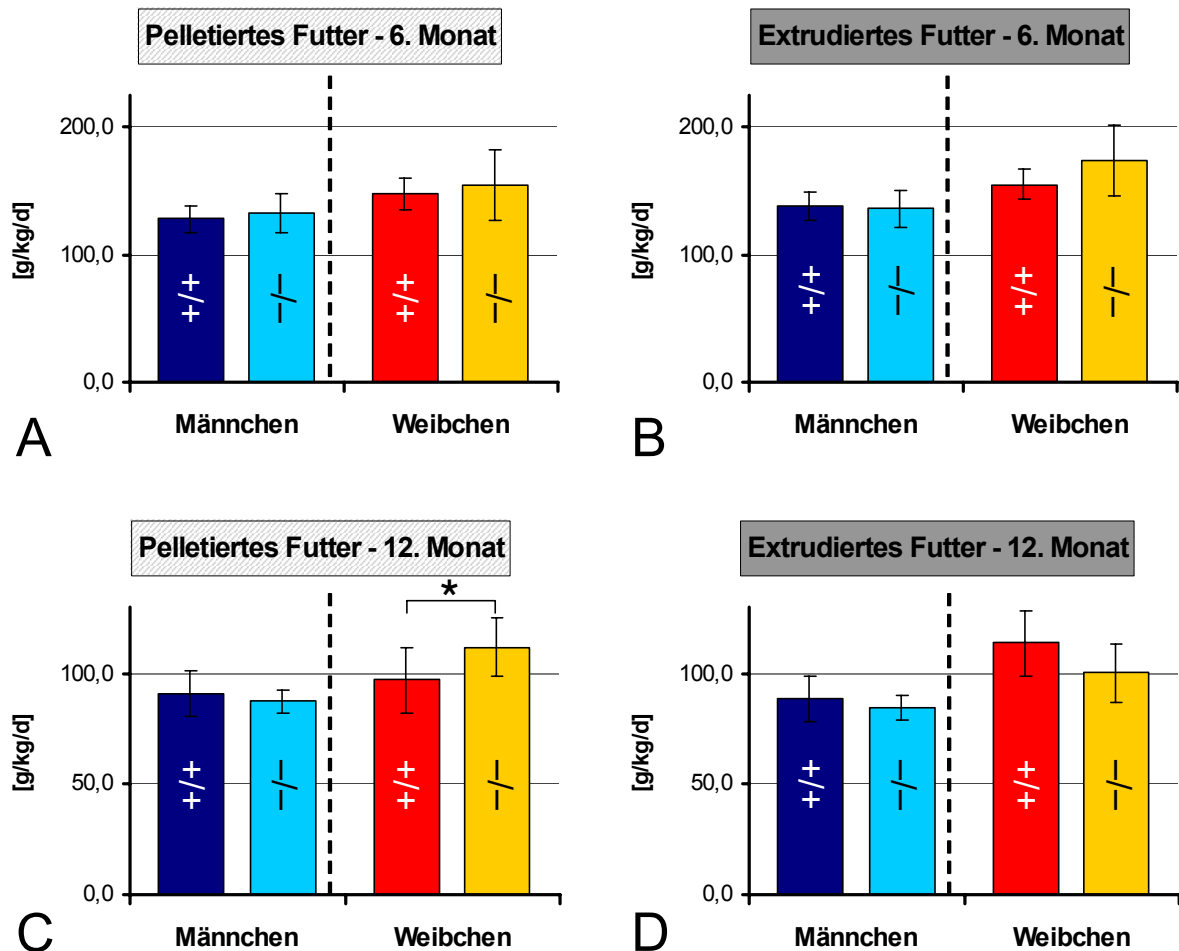


Abb. 22: Futterverbrauch (ad libitum) von pelletiertem bzw. extrudiertem Futter bei 6 und 12 Monate alten Tieren (Gruppe 2).

Die Gruppen (jeweils $+/+$ vs. $-/-$) wurden mittels t-Test verglichen (keine signifikanten Differenzen bis auf Vergleich der Weibchen bei pelletiertem Futter im 12. Monat). Angabe der Fehlerindikatoren als SD.

Anzahl der Tiere (N):

Weibchen: Pelletiertes Futter: 4 ($+/+$), 9 ($-/-$); Extrudiertes Futter: 5 ($+/+$), 10 ($-/-$).

Männchen: Pelletiertes Futter: 8 ($+/+$), 10 ($-/-$); Extrudiertes Futter: 7 ($+/+$), 10 ($-/-$).

*: $P \leq 0,05$

IV - 3.6. Energiehaushalt

Da sich beide Genotypen in ihrer Futteraufnahme kaum unterschieden, könnte eine veränderte Stoffwechselrate Ursache für das Übergewicht der Knockouttiere sein. Über die indirekte Kalorimetrie werden zunächst der Verbrauch an Sauerstoff und die Abgabe von Kohlendioxid ermittelt werden. Diese können erste Hinweise über Unterschiede in der Verbrennung von Energiereserven geben. Der sich daraus errechnende respiratorische Quotient (RQ) gibt Aufschluss über die Art der oxidierten

Energiereserven (siehe Methoden). Aus diesen Verbrauchsdaten lässt sich indirekt über Vergleichswerte (kalorische Äquivalente) die dabei frei werdende Wärmemenge berechnen.

RQ-Werte von $0,743 \pm 0,006$ bei den NEP ($-/-$) bzw. $0,731 \pm 0,017$ bei den NEP ($+/+$) weisen auf eine Verbrennung von Fetten und Proteinen hin, dagegen nicht auf eine Kohlenhydrat-Verbrennung (Abb. 23, links). Es gibt also keine Anzeichen für eine unterschiedliche Verbrennung der Energiereserven zwischen den beiden Genotypen ($P > 0,05$). Auch die produzierte Wärmemenge zeigt keinerlei signifikante Differenzen ($0,471 \pm 0,016$ kcal/h bei den NEP [$-/-$] bzw. $0,476 \pm 0,049$ kcal/h bei den NEP [$+/+$], $P > 0,05$, Abb. 23, rechts).

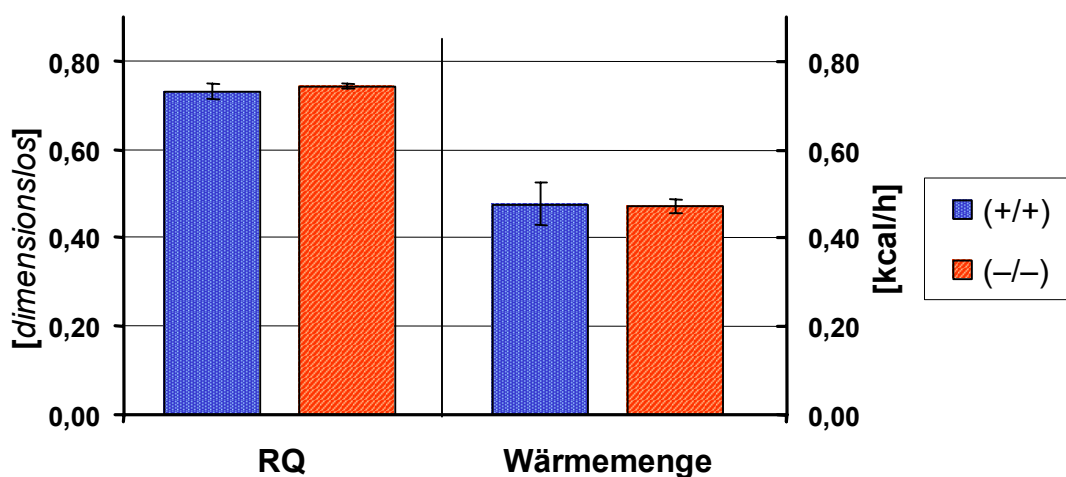


Abb. 23: Respiratorischer Quotient (RQ) und produzierte Wärmemenge pro Stunde.

Die Werte (gemittelt über beide Futtersorten) Tiere wurden mittels t-Test ausgewertet (keine signifikanten Unterschiede).

Anzahl der Tiere (N): 4 (+/+), 17 (-/-).

IV - 3.7. Zusammenhang von NEP-Aktivität und Körpergewicht

IV - 3.7.1. NEP-Aktivitäten im Hypothalamus wildtypischer Mäuse (Gruppe 2)

Da der Hypothalamus eines der wichtigsten Zentren hormoneller Steuerung des ZNS darstellt, wurde überprüft, ob in dieser Region die NEP-Aktivität wildtypischer Tiere in einem Zusammenhang mit dem Körpergewicht steht. Der Pearson-Korrelationseffizient aller untersuchten Tiere der Gruppe 2 beträgt $0,227$ ($P > 0,05$).

Auch bei statistischer Analyse einzelner Gruppen (innerhalb eines Geschlechts, einer Futtersorte) resultieren immer Korrelationskoeffizienten unter 0,6. In den wildtypischen Mäusen dieses Versuches konnte folglich für die NEP-Aktivität im Hypothalamus kein Zusammenhang mit dem Körpergewicht nachgewiesen werden. Diese fehlende Korrelation könnte einerseits von den zu geringen Gewichtsunterschieden zwischen den untersuchten Gruppen herrühren, andererseits aber auch durch die Heterogenität der Gruppen verursacht worden sein (Tiere unterschiedlichen Geschlechts und/oder unterschiedlicher Futtersorte).

IV - 3.7.2. NEP-Aktivitäten in peripheren Organen übergewichtiger und normalgewichtiger Mausstämmen (Gruppe 5)

Um die Übertragbarkeit des NEP-Gewichts-Konzeptes auf andere Tiermodelle zu testen, wurde die NEP-Aktivität in zwei weiteren Mausstämmen untersucht. Der Stamm DU6i wurde am FBN in Dummerstorf auf dem Hintergrund des Stammes

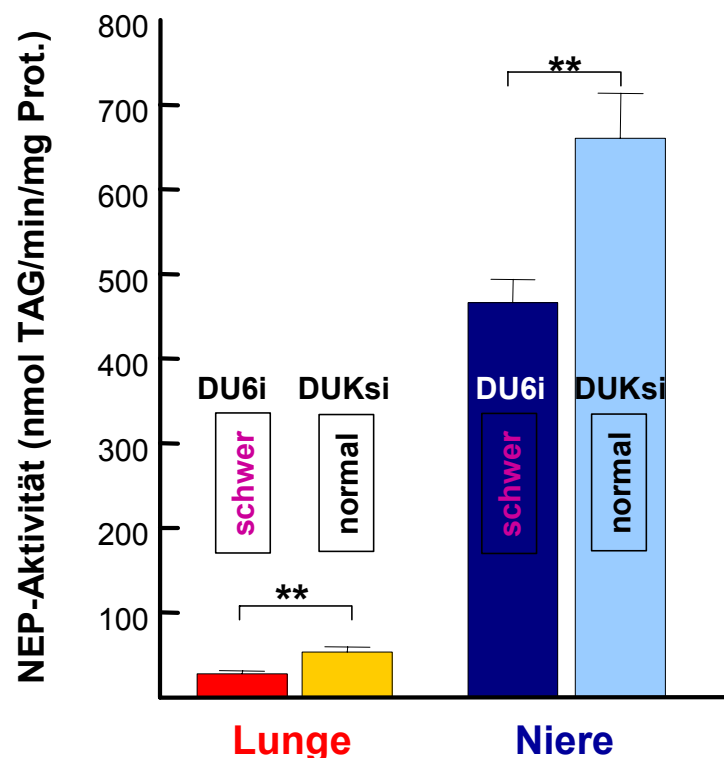


Abb. 24: NEP-Aktivität in Organen von schwergewichtigen DU6i-Mäusen und dem Kontrollstamm DUKsi.

Körpergewicht DU6i: 97,7 g \pm 2,3 g, N=8 ; Körpergewicht DUKsi: 40,0 g \pm 0,9 g, N=10. Die Mittelwerte der Gewichte und NEP-Aktivitäten wurden durch t-Test verglichen.

★ ★: $P \leq 0,01$

DUKsi selektiv auf Übergewicht gezüchtet [Buenger, 90]. Die NEP-Aktivität wurde in der Lunge und in der Niere beider Gruppen gemessen (die Tiere wurden von C. C. Metges/ FBN zur Verfügung gestellt). Bei den übergewichtigen DU6i-Tieren (mittleres Körpergewicht: 97,7 g) war die NEP-Aktivität in beiden Organen signifikant niedriger als bei den DUKsi-Kontrolltieren (mittleres Körpergewicht: 40,0 g; Abb. 24).

IV - 3.8. Peptidabbau durch die NEP

Wie in der Einleitung beschrieben, stellen eine Anzahl von orexigenen bzw. anorexigenen Peptiden gute Substrate der NEP dar. Bei Betrachtung weiterer orexigener bzw. anorexigener Peptide fielen einige als potentielle Kandidaten für den Abbau durch die NEP auf. Davon wurden folgende ausgewählt, um auf Hydrolyse durch die NEP getestet zu werden (siehe auch Tab. 6): die Orexine A und B, das am Ser³ octanoylierte Ghrelin (sowie Des-Octanoyl-Ghrelin), Galanin, AGRP 86-132, CRH, GLP-1 und CART 55-102. Keins dieser Peptide ist länger als 48 Aminosäuren, und alle enthalten eine oder mehrere typische Spaltstellen der NEP. Unter *In-vitro*-Bedingungen, die bei humanem A β zu vollständigem Abbau führten, konnte bei den Orexinen, Des-Octanoyl-Ghrelin, AGRP 86-132 und CART 55-102 kein Abbau festgestellt werden. Ghrelin zeigte bei langer Inkubationszeit (>2h) mit löslicher, aufgereinigter NEP (siehe Kap. II - 2.2) eine Reduktion des Peptids um ca. 15%, die sich durch Candoxatrilat hemmen ließ; der Abbau durch Gesamthirn-Membranen ließ sich jedoch durch Candoxatrilat nicht inhibieren. Der geringfügige Abbau durch die lösliche NEP wurde als marginal für die Steuerung des Ghrelin-Stoffwechsels eingestuft und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

IV - 3.8.1. CRH und GLP-1

In Vorversuchen zum CRH-Abbau wurde bereits bei kurzer Inkubationszeit nach HPLC-Separation eine deutliche Reduktion des CRH-Signals beobachtet. Während des Bearbeitungszeitraums wurde allerdings ein Artikel veröffentlicht, der detaillierte Aussagen zum Abbau von CRH durch die NEP zum Inhalt hatte. Die dort beschriebenen Untersuchungen (mit unterschiedlichen Enzymquellen sowie mit aufgereinigtem Enzym durchgeführt) wurden als ausreichend für eine Verwendung in

unserer Argumentation erachtet. Der von Ritchie et al. ermittelte K_m -Wert von 42 μM [Ritchie, 03] entsprach den von uns ermittelten hohen Abbaugeschwindigkeiten.

Ebenso konnte in Vorversuchen ein deutlicher Abbau von GLP-1 durch die NEP beobachtet werden. Ein solcher Zusammenhang wurde zwar schon in einer früheren Arbeit beschrieben [Hupe-Sodmann, 97], allerdings sind diese Ergebnisse lediglich an Zellen unter Verwendung der nicht sehr spezifischen Inhibitoren Thiorphan und Phosphoramidon erzielt worden. Hier wird dagegen der Katabolismus von GLP-1 durch reines rekombinantes Enzym beschrieben. Mit rekombinanter NEP (0,27ng/ μl) wurden 4 μM Peptid innerhalb von 60 min fast vollständig abgebaut, die $t_{1/2}$ lag unter 20 min. Die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen hinsichtlich Körpergewicht, Diabetes mellitus sowie Lernen und Gedächtnis wurden als so wichtig eingestuft, dass weitere Aspekte zum GLP-Abbau Thema einer separaten Arbeit werden.

IV - 3.8.2. Galanin

Weitere Abbauprobungen zeigten, dass das stark orexigene Peptid Galanin ebenfalls ein gutes Substrat der NEP ist. Abb. 25 zeigt Abbaukurven von Galanin während der Inkubation sowohl mit Membranpräparationen aus wildtypischem Großhirn als auch mit dem aufgereinigten löslichen Enzym. Die Abbaukurven mit Hirnmembranen (Abb. 25A) zeigen, dass die NEP von großer Bedeutung für den Galanin-Abbau ist. Nach 1 h wurde durch die ungehemmte Membran bereits mehr als doppelt so viel Peptid abgebaut wie durch die NEP-gehemmten Membranen. Für die verbleibende Galanin-hydrolysierende Aktivität (nach Inhibierung der NEP) sind nicht zwangsläufig Enzyme verantwortlich, welche unter physiologischen Bedingungen für den spezifischen Galanin-Abbau relevant sind. In den Membran-Präparationen aus Großhirn ist nämlich eine Vielzahl an unspezifischen, membranständigen Enzymen enthalten, welche das Galanin nicht an dessen Freisetzungs- oder Wirkort hydrolysieren oder unter physiologischen Umständen erst gar nicht in Kontakt mit dem Galanin kommen. Für einen weiteren Beweis der Hydrolysierbarkeit von Galanin durch die NEP wurde das Peptid mit der aufgereinigten löslichen NEP inkubiert. Der resultierende Abbau wurde durch Candoxatrilat vollständig inhibiert (Abb. 25B). In einer weiteren Messreihe wurde der K_m -Wert mit 41,7 μM ermittelt. Dieser Wert weist das Galanin als ähnlich gutes Substrat der NEP aus wie SP (31,9 μM) oder [Met⁵]-Enkephalin (62,0 μM).

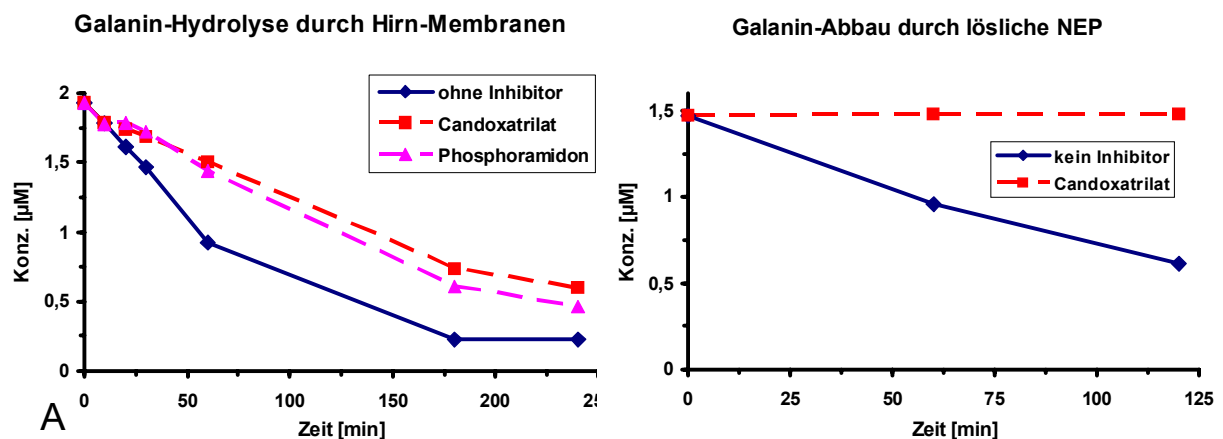


Abb. 25: Hydrolytischer Abbau von Galanin (A) durch Hirnmembranen von wildtypischen Mäusen und (B) durch aufgereinigte lösliche NEP.

Die Bedeutung der NEP für den Galanin-Abbau *in vivo* belegen auch Mikrodialyse-Experimente, die in Kooperation mit R. Richter (FMP) durchgeführt wurden. Dabei wurde über eine Sonde Galanin in den Hippocampus von wildtypischen Mäusen appliziert und an gleicher Stelle zu drei Zeitpunkten innerhalb 1 h Proben aus dem austretenden Dialysat entnommen. Danach wurde für 2 h mit Candoxatrilat (5 mM) perfundiert und anschließend wieder zu drei Zeitpunkten innerhalb 1 h Proben aus dem Dialysat entnommen. In den Dialysaten wurden per Massenspektrometrie Galanin und daraus entstandene Bruchstücke analysiert. Diese Methode erlaubt nur semiquantitative Aussagen – es wurde aber deutlich, dass nach Einspritzung von Galanin zusammen mit Candoxatrilat die Galanin-Signale stärker wurden und einige vorher große Bruchstück-Signale nicht mehr vorhanden oder deutlich verringert waren. Im Folgenden sind die Bruchstück-Signale aufgeführt, die zu allen drei Zeitpunkten vor Candoxatrilat-Gabe sehr deutlich und danach kaum vorhanden waren. Sie konnten folgenden Galanin-Teilsequenzen zugeordnet werden. Hierbei sind die Bruchstücke nach absteigender Größe der korrespondierenden HPLC-Peaks aufgeführt; die Anzahl der Sternchen spiegelt in etwa die Größe des HPLC-Peaks wider. Einige Bruchstücke haben gleiche theoretische Massen. Die aus theoretischer Sicht wahrscheinlicheren Bruchstücke sind in fetter Schriftart hervorgehoben. Die jeweilige Aminosäuresequenz ist dahinter mit Unterstreichung aufgeführt. Bei alternativen Möglichkeiten ist nur die wahrscheinlichere abgebildet.

Die jeweils folgende Aminosäure N- und C-terminal von der Spaltstelle ist ohne Unterstreichung in Klammern angegeben.

Sequenz 1-30:

Gly¹-Trp²-Thr³-Leu⁴-Asn⁵-Ser⁶-Ala⁷-Gly⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Pro¹³-His¹⁴-Ala¹⁵-Val¹⁶-Gly¹⁷-Asn¹⁸-His¹⁹-Arg²⁰-Ser²¹-Phe²²-Ser²³-Asp²⁴-Lys²⁵-Asn²⁶-Gly²⁷-Leu²⁸-Thr²⁹-Ser³⁰

- **(1-9)** [Gly¹-Trp²-Thr³-Leu⁴-Asn⁵-Ser⁶-Ala⁷-Gly⁸-Tyr⁹-(Leu¹⁰-)] oder (21-29) oder **(22-30)** [(-Ser²¹)-Phe²²-Ser²³-Asp²⁴-Lys²⁵-Asn²⁶-Gly²⁷-Leu²⁸-Thr²⁹-Ser³⁰] ****:
alle Bruchstücke haben die gleiche theoretische Masse; (1-9) und (22-30) sind jedoch aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität am wahrscheinlichsten
- **(16-30)** ** bis **** [(-Ala¹⁵)-Val¹⁶-Gly¹⁷-Asn¹⁸-His¹⁹-Arg²⁰-Ser²¹-Phe²²-Ser²³-Asp²⁴-Lys²⁵-Asn²⁶-Gly²⁷-Leu²⁸-Thr²⁹-Ser³⁰]
- **(16-22)** *** [(-Ala¹⁵)-Val¹⁶-Gly¹⁷-Asn¹⁸-His¹⁹-Arg²⁰-Ser²¹-Phe²²-(Ser²³-)]: auch nach Candoxatrilat-Gabe noch deutliches Signal, aber schwächer als vor Candoxatrilat-Gabe
- **(1-21)** [Gly¹-Trp²-Thr³-Leu⁴-Asn⁵-Ser⁶-Ala⁷-Gly⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Pro¹³-His¹⁴-Ala¹⁵-Val¹⁶-Gly¹⁷-Asn¹⁸-His¹⁹-Arg²⁰-Ser²¹-(Phe²²-)] oder **(10-30)** [(-Tyr⁹)-Leu¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Pro¹³-His¹⁴-Ala¹⁵-Val¹⁶-Gly¹⁷-Asn¹⁸-His¹⁹-Arg²⁰-Ser²¹-Phe²²-Ser²³-Asp²⁴-Lys²⁵-Asn²⁶-Gly²⁷-Leu²⁸-Thr²⁹-Ser³⁰] ** bis ***:
beide Bruchstücke haben die gleiche theoretische Masse und sind aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität gleich wahrscheinlich
- **(1-7)** oder **(2-8)** [(Gly¹)-Trp²-Thr³-Leu⁴-Asn⁵-Ser⁶-Ala⁷-Gly⁸-(Tyr⁹-)] oder (19-24) **: alle Bruchstücke haben die gleiche theoretische Masse; (1-7) und (19-24) sind jedoch aus theoretischen Überlegungen zur Substratspezifität sehr unwahrscheinlich
- **(7-15)** ** [(-Ser⁶)-Ala⁷-Gly⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Pro¹³-His¹⁴-Ala¹⁵-(Val¹⁶-)]
- **(1-10)** ** [Gly¹-Trp²-Thr³-Leu⁴-Asn⁵-Ser⁶-Ala⁷-Gly⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-(Leu¹¹-)]
- **(1-27)** * [Gly¹-Trp²-Thr³-Leu⁴-Asn⁵-Ser⁶-Ala⁷-Gly⁸-Tyr⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Pro¹³-His¹⁴-Ala¹⁵-Val¹⁶-Gly¹⁷-Asn¹⁸-His¹⁹-Arg²⁰-Ser²¹-Phe²²-Ser²³-Asp²⁴-Lys²⁵-Asn²⁶-Gly²⁷-(Leu²⁸-)]

IV - 4. DISKUSSION

Die NEP ist, wie bereits mehrfach dargestellt, am Katabolismus einer großen Zahl von Peptidhormonen beteiligt. Dies führt zu vielfältigen Beziehungen der NEP zu physiologischen und pathologischen Zuständen des Organismus. Die Funktionen der NEP bei der Blutdruckregulation, bei Suchtprozessen und bei der Alzheimerschen Erkrankung wurden bereits ausführlich dargestellt.

Dass die NEP bei Suchtvorgängen eine wichtige Funktion ausübt, wurde wegen ihrer Fähigkeit zur Enkephalin-Hydrolyse früh postuliert [Malfroy, 78]. Auch das Wissen um weitere NEP-Substrate wie NPY oder CRH, für die eine Funktion im Suchtgeschehen bekannt ist, legt diesen Zusammenhang nahe. Die genannten Peptide üben aber auch einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme aus. Somit sind bisher unbekannte Einflüsse der NEP auf die Entwicklung des Körpergewichtes nahe liegend. Wie allerdings die NEP in die Regulierung der Nahrungsaufnahme bzw. des Körpergewichtes involviert ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

IV - 4.1. Allgemeiner Phänotyp

Während unserer Arbeiten mit NEP-Knockout-Mäusen in Bezug auf die Alkoholaufnahme und auf die Alzheimersche Erkrankung fiel auf, dass viele dieser Tiere besonders in der 2. Lebenshälfte im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen ein erhöhtes Körpergewicht sowie große Fettansammlungen im Bauchraum aufweisen. Die exakte Erfassung dieses Gewichtsunterschiedes über längere Zeiträume war die Grundlage für spätere Untersuchungen.

Zunächst waren die eindrucksvollen Gewichtsunterschiede, wie sie aus den vorher beobachteten *Einzelbefunden* zunächst abgeleitet wurden, bei den Tieren der zunächst untersuchten **Gruppe 1** im *Mittelwert* nicht derart ausgeprägt. Vielmehr zeichnete sich ein differenzierteres Bild: Die Ausprägung des Übergewichtes der NEP-Knockout-Tiere hing von deren Alter, der verwendeten Futtersorte sowie von den generellen Haltungsbedingungen ab. In diesem 1. Teilversuch nahmen beide Genotypen während der ersten 8 – 9 Monate kontinuierlich an Gewicht zu; danach

verringerte sich bei den wildtypischen Mäusen die Zunahme des Körpergewichtes spürbar und mündet in eine Plateauphase, während die Knockouttiere bis zu ihrem Lebensende an Gewicht zunahmen. Dieser Effekt wurde möglicherweise durch höhere Stressorbelastung verursacht (hohe Gesamtbelegung der Räume, in denen dieser Teilversuch stattfand; höhere Käfigbelegung; relativ motivationsarme Käfiggestaltung). Bei Haltung in weniger belegten Räumen, in Käfigen mit zwei Mäusen und unter Zusatz von Zellstofftuchern („enriched environment“) war die Gewichts Differenz zwischen den Genotypen dagegen deutlich größer: ca. 8 – 9 g bei den Männchen und ca. 4 g bei den Weibchen (**Gruppe 2**, extrudiertes Futter).

IV - 4.2. Einfluss verschiedener Futtersorten

Ein weiterer eindrucksvoller Effekt wurde durch verschiedene Futtersorten verursacht. Bei einem Wechsel von pelletiertem zu extrudiertem Futter kam es innerhalb von 1 – 2 Wochen zu einem deutlichen Gewichtszuwachs, der zwar auch die Wildtypen betraf, bei den Knockout-Mäusen jedoch wesentlich stärker ausgeprägt war. Bemerkenswert ist, dass es sich bei letzterer Futtersorte *nicht* um eine energie- oder fettreichere Diät handelte, sondern lediglich um einen Unterschied im Herstellungsverfahren. Bei der Herstellung des extrudierten Futters wirken höhere Temperaturen und Drücke auf die Futtermischung ein, was zu einem partiellen Aufschluss bestimmter Kohlenhydrate führt (siehe weiter unten).

In einer umfangreichen prospektiven Studie wurde danach unter möglichst stressarmen Bedingungen das Körpergewicht beider Genotypen und Geschlechter über einen Zeitraum von ca. 15 – 16 Monaten unter Verabreichung von pelletiertem und extrudiertem Futter – gleichmäßig auf alle Gruppen verteilt – verfolgt (**Gruppe 2**). Bei den Männchen wie bei den Weibchen zeichnete sich ein vergleichbares Bild: Bei beiden Futtersorten lagen die gemittelten Gewichtskurven der Knockouttiere über denen der Wildtypen. Beim *pelletierten* Futter trat diese Differenz allerdings erst später ein. Die mit diesem Futter gefütterten Knockout- und Wildtypiere zeigen im Kurvenverlauf über den gesamten Zeitraum keinen signifikanten Unterschied; erst in den letzten 10 Wochen (annähernd Plateauphase) weisen die Knockouttiere auch bei diesem Futter ein signifikant erhöhtes Körpergewicht auf (ca. 3g). Die mit *extrudiertem* Futter gefütterten NEP-Knockout-Mäuse hatten dagegen deutlich steilere Gewichtskurven als die vergleichbaren

Wildtypiere, obwohl auch hier die Auseinanderentwicklung nicht unmittelbar einsetzte. Das gegenüber den Wildtypen erhöhte Körpergewicht der männlichen Knockout-Mäuse war bei extrudiertem Futter auch über den gesamten Kurvenverlauf hoch signifikant.

Der unterschiedliche Einfluss von pelletiertem und extrudiertem Futter auf das Körpergewicht ist bereits in der Literatur erwähnt worden, die Ursache aber noch nicht befriedigend beantwortet. Zur näheren Charakterisierung dieses Unterschiedes wurden beide Futtersorten in Kooperation mit C. C. Metges et al. am FBN in Dummerstorf noch eingehend untersucht: Dabei wurde gefunden, dass extrudiertes Futter, bedingt durch das Herstellungsverfahren bei höherem Druck und höherer Temperatur, durch α -Amylase zu 100% aufgeschlossen wird – im Gegensatz zu 81% bei pelletiertem Futter. Die Stärke in extrudiertem Futter lässt sich daher im Gegensatz zur Stärke in pelletiertem Futter von den Mäusen besser verdauen und folglich resorbieren und metabolisieren. Warum sich dieser Unterschied allerdings bei den NEP-Knockout-Mäusen wesentlich stärker auf das Körpergewicht auswirkt, bleibt unklar. Hier scheint die genetische Veranlagung zum Tragen zu kommen. Geringe Unterschiede in der Nahrung, die bei wildtypischem Genotyp nur geringe Auswirkungen auf den Phänotyp haben, können bei genetischer Prädisposition (NEP-Defizienz) das Körpergewicht wahrscheinlich gravierender beeinflussen.

In einer weiteren Langzeitstudie wurde untersucht, ob auch fettreiche Nahrung in einem ähnlichen Maße wie das extrudierte Futter die Differenz zwischen den Körpergewichten beider Genotypen vergrößert (**Gruppe 4**). Die mit fettreicher Diät gefütterten Tiere unseres Versuches waren zwar – wie zu erwarten – deutlich schwerer, und die Differenz zwischen Knockout- und Wildtypieren war ebenfalls groß, jedoch nahm sie gegenüber der Standarddiät nicht in dem Maße zu wie bei dem Vergleich von pelletiertem und extrudiertem Futter.

Da also durch das fettreiche Futter das Körpergewicht der Wildtypen fast ebenso stark erhöht wurde wie bei den Knockout-Mäusen, ist zu vermuten, dass die Wirkung der NEP nicht in demselben Maße durch den Fettgehalt der Nahrung beeinflusst wird, wie durch deren Kohlenhydrate. Die Ursache hierfür lässt sich aus diesen Experimenten nicht ableiten.

Unsere Ergebnisse zeigen eine spät einsetzende Entwicklung zu Übergewicht und Fettleibigkeit bei den NEP-Knockout-Mäusen. Dieser genetisch bedingte Trend wird

deutlich beeinflusst durch eine Reihe von äußeren Faktoren wie Stress und Futterqualität. Im Unterschied zu anderen monofaktoriellen Adipositas-Tiermodellen (z. B. Leptin-defizienten Tieren) werden die Fettakkumulation und die Zunahme des Körpergewichtes nicht nur von einem Hormon-Rezeptor-System beeinflusst. Die Vielzahl von NEP-Substraten mit orexigenen oder anorexigenen Eigenschaften, aber auch mit Beziehungen zu Stressverarbeitung und anderen physiologischen Vorgängen, führen zu einem Phänotyp, der letztlich dem polyfaktoriellen Gesamtbild der menschlichen Adipositas weit mehr entspricht als die vorgenannten Modelle. Die NEP könnte daher eine übergeordnete „Schaltstelle“ sein, die über ihre Substrate in die verschiedenen Regelkreise der Nahrungsaufnahme, des Nahrungsstoffwechsels und des Energiehaushalts und damit auch des Körpergewichts eingreift.

IV - 4.3. Anteil von Körperfett, Muskelmasse und Extrazellulärflüssigkeit am Gesamtkörpergewicht

Zur Charakterisierung des Phänotyps der übergewichtigen NEP-Knockout-Mäuse sollte belegt werden, inwieweit deren höheres Körpergewicht vor allem auf einen höheren Fettanteil zurückzuführen ist. Dies war zwar schon nach Tötung und Organentnahme bei einzelnen Tieren vermutet worden, die Einzelfallbeobachtung wurde nun durch Analyse der Körperzusammensetzung einer größeren Gruppe von NEP-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen bestätigt (**Gruppe 4**). Im Gegensatz zu den herkömmlichen Methoden wie Röntgenanalyse oder Wägung ausgewählter Fettgewebe ermöglichte uns die Verwendung eines NMR-Gerätes die Untersuchung am lebenden Tier und über einen größeren Zeitraum.

Die NEP-defizienten Tiere besaßen nicht nur wesentlich größere *absolute* Fettmengen; auch der *prozentuale* Anteil des Fettgewichts am Gesamtkörpergewicht betrug zu Ende des Beobachtungszeitraumes bei der Knockout-Gruppe mit fettreichem Futter 60% im Gegensatz zu nur 50% bei den Wildtypen der gleichen Futtergruppe, 40% bei den Knockouttieren mit Standardfutter und lediglich 20% bei den Wildtypen mit Standardfutter. Parallel dazu sank dagegen der prozentuale Anteil der Muskelmasse am Gesamtkörpergewicht, die absolute Muskelmasse in den einzelnen Gruppen erhöhte sich nur unwesentlich. Die freie Körperflüssigkeit wiederum zeigte keine Abhängigkeit vom Genotyp – sie nahm aber in allen Gruppen, die mit fettreichem Futter gefüttert wurden, zu.

IV - 4.4. Biochemische Stoffwechselfparameter

Nach Beschreibung des Phänotyps stellte sich die Frage nach möglichen Mechanismen der Adipositas-Entstehung bei NEP-Knockout-Mäusen. Der Verweis auf die Substrate der NEP allein (s. unten) gibt darauf noch keine hinreichende Antwort, da sich darunter sowohl orexigene als auch anorexigene befinden. Weiterhin könnten diese peptidischen Substrate zwar mögliche Ursachen für die unterschiedliche Fett- und Gewichtszunahme bei den NEP-defizienten Tieren erklären; diese Stimuli müssen jedoch auch einen Niederschlag im Fett- und Energiestoffwechsel finden. Zunächst wurden deshalb an verschiedenen der oben aufgeführten Tiergruppen mehrere biochemische Parameter mit Bezug zum Energie- und Fettstoffwechsel erfasst.

Einen ersten Hinweis auf die veränderte Stoffwechsellage der NEP-Knockout-Mäuse ergaben der OGT sowie die Messung der Nüchtern-Glucosekonzentration (**Gruppe 3**). In diesem Versuch verliefen die Kurven der Knockout-Mäuse bei beiden Geschlechtern signifikant oberhalb der der Wildtypen, was für eine geringere Glucosetoleranz spricht. Schon die basale Glucosekonzentration im nüchternen Zustand war im Blut der Knockouttiere höher als bei den Wildtypen. Dieser Unterschied war jedoch bei den Tieren der **Gruppe 2** nicht nachweisbar, bei denen die Glukosekonzentration nicht nach 8 h Nüchternheit (wie beim OGT), sondern nach ständigem freien Zugang zum Futter bestimmt wurde. Die veränderte Stoffwechsellage der NEP-Knockout-Mäuse scheint sich aber nicht nur nach massiver Glucoseapplikation, sondern bereits im nüchternen Zustand auszuwirken. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Knockouttiere die applizierte Glucose schlechter aus dem Blutkreislauf in die Zellen transportieren können.

Aufgrund der starken Fetteinlagerungen, auf die letztlich das erhöhte Körpergewicht der NEP-Knockout-Mäuse zurückzuführen ist, wurden vor allem bei Parametern des Fettstoffwechsels, wie Triglyceriden und Lipoproteinen, deutliche Veränderungen erwartet – was sich nicht bestätigte. Bei diesen Werten wurden beim Vergleich Knockout vs. Wildtyp kaum Unterschiede beobachtet, die in allen Gruppen konsistent waren. So waren z. B. die Triglyceride bei den Knockouttieren der Gruppe Männchen/extrudiertes Futter signifikant erhöht, dagegen aber bei den Männchen/pelletiertes Futter und den Weibchen/extrudiertes Futter tendenziell erniedrigt und bei den Weibchen/pelletiertes Futter annähernd gleich. Die einzigen

bei mehreren Gruppen sichtbaren Tendenzen zeigten sich beim HDL-Wert und beim Gesamtcholesterol. Überraschenderweise ergaben sich bei den NEP-Knockout-Mäusen jedoch *erniedrigte* Werte. Für generell *erhöhte* Blutfettwerte bei den Knockouttieren, wie sie aus deren erhöhtem Körpergewicht und den erhöhten Fettmassen erwartet wurden, gab es dagegen keine Hinweise.

Das für den Fettstoffwechsel und allgemein für das Körpergewicht wichtige Leptin wurde im Serum der Tiere der **Gruppe 4** untersucht. Zwar zeigte sich auch hier – ähnlich den Ergebnissen zur Wärmemenge – bei beiden Genotypen die erwartete eindeutige Korrelation zum Körpergewicht; Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Knockout-Mäusen waren jedoch nicht nachweisbar. Hierbei ist anzumerken, dass die Anzahl der wildtypischen Mäuse zum Versuchsende für eine sichere Ermittlung von Differenzen nicht mehr ausreichend waren.

IV - 4.5. Energiebilanz (Futtermittelaufnahme und Stoffwechselrate)

Bei Betrachtung der Energiebilanz kann das erhöhte Körpergewicht der NEP-Knockout-Mäuse grundsätzlich auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Zum einen könnte die Futtermittelaufnahme bei den Knockout-Mäusen erhöht sein, zum anderen könnte die Stoffwechselrate bei diesen Tieren erniedrigt sein, d. h. dass die aufgenommene Nahrung in stärkerem Maße in Fettdepots eingelagert wird und/oder die Verbrennung dieser Energiereserven erniedrigt ist. In beiden Fällen – der erhöhten Futtermittelaufnahme und der erniedrigten Stoffwechselrate – wäre die Energieaufnahme erhöht (positive Energiebilanz). In mehreren Versuchen wurde jedoch kein eindeutiger Beweis für eine erhöhte Futtermittelaufnahme festgestellt. Es muss jedoch erwähnt werden, dass sowohl in einem Experiment zum Alkoholverbrauch [Siems, 00] als auch bei bisher unveröffentlichten Teilversuchen am FBN in Dummerstorf (persönliche Mitteilung von C. C. Metges) ein erhöhter Futtermittelverbrauch festgestellt wurde. Ebenso soll hier auf einen Versuch zur oralen Applikation von Candoxatril hingewiesen werden. Bei einer solchen pharmakologischen Inhibierung der NEP wurde neben dem erwarteten Anstieg des Körpergewichts auch ein signifikant erhöhter Futtermittelverbrauch beobachtet (auf diese Beobachtung wird weiter unten näher eingegangen).

Bei der respiratorischen Austauschrate und der abgegebenen Wärmemenge ergaben sich ebenfalls keine eindeutigen Differenzen zwischen den Genotypen. Dagegen gab es – wie zu erwarten – bei beiden Genotypen einen klaren Zusammenhang zwischen erzeugter Wärmemenge und Körpergewicht; bei der respiratorischen Austauschrate war die Korrelation weniger eindeutig.

Aus diesen Ergebnissen wird nicht ersichtlich, woraus das erhöhte Körpergewicht und die Adipositas der NEP-Knockout-Mäuse resultieren. Ein möglicher Grund für das Fehlen von Unterschieden in den hier beschriebenen Experimenten besteht darin, dass die evtl. vorhandenen geringen Differenzen durch die Messungen der Energieauf- und -abnahme (besonders der Futteraufnahme) über den relativ kleinen Messzeitraum (max. 2 Wochen) hinweg nicht detektiert werden können. Solche geringen Differenzen, z. B. beim Futterverbrauch, können sich aber über den großen Zeitraum bis zum Auseinanderdriften der Gewichtskurven (mehrere Monate) derartig summieren, dass es im Laufe der Zeit zu einem Gewichtsunterschied kommt (siehe Beispielrechnung in der Einleitung). Solche geringen Differenzen wurden zwar in einigen Teilversuchen durchaus beobachtet. Diese Unterschiede waren aber nur in wenigen Fällen signifikant und wurden auch nicht in jeweils beiden Geschlechts-, Futter- bzw. Altersgruppen mit der gleichen Tendenz beobachtet. Umgekehrt wurde aber auch in keinem Teilexperiment bei den Knockouttieren eine *geringere* Futteraufnahme oder ein *erhöhter* Energieverbrauch beobachtet. Die hier beschriebenen Ergebnisse können eine positive Energiebilanz bei den NEP-Knockout-Mäusen zwar nicht zweifelsfrei belegen. Zusammen genommen mit weiteren Experimenten unserer AG und von Kooperationspartnern weisen sie jedoch in diese Richtung. Diese Fragestellung wird daher Gegenstand weiterer intensiver Forschung unserer Arbeitsgruppe sein.

IV - 4.6. Orexigene und anorexigene Substrate der NEP

Die biochemischen Prozesse, die zur Fettakkumulation und zum erhöhten Körpergewicht bei den NEP-Knockout-Mäusen führen, sind – wie dargelegt – noch weitgehend unklar und werden Gegenstand neuer Untersuchungen mit verfeinerten Methoden sein. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass die molekularen Ursachen für den adipösen Phänotyp dieser Tiere im NEP-abhängigen Katabolismus von Peptidhormonen (oder anderen peptidischen Mediatoren) liegen müssen. In Tab. 6 in

128

der Einleitung wurden bekannte Substrate aufgeführt, die orexigene oder anorexigene Eigenschaften haben. Da jedoch auch in weiteren wichtigen orexigenen und anorexigenen Peptiden typische NEP-Spaltsequenzen ausgemacht wurden, wurden einige dieser Verbindungen auf ihre Hydrolysierbarkeit durch die NEP untersucht. Bei den orexigenen Peptiden Orexin A und B, Ghrelin, Des-Octanoyl-Ghrelin und AGRP sowie bei dem anorexigenen CART konnte eine Hydrolyse durch die NEP nicht nachgewiesen werden. Für weitere Substrate wie NPY, PYY, GLP-1 und CRH wurde der schnelle Abbau durch die NEP – der nach Literaturangaben z. T. nicht eindeutig auf die NEP zurückzuführen war – mit Hilfe des reinen rekombinanten Enzyms bestätigt. Im Fall von Galanin, einem orexigenen Peptid mit 30 Aminosäuren, wird ein schneller Abbau durch die NEP hier erstmals beschrieben. Bei Inkubation mit wildtypischen Hirnmembran-Präparationen bzw. mit löslicher aufgereinigter NEP wurde die Galanin-Hydrolyse durch NEP-Inhibitoren teilweise bzw. vollständig gehemmt. Der errechnete K_m -Wert von 41,7 μM stellt Galanin in eine Reihe mit besonders guten Substraten der NEP wie den Enkephalinen, SP, CCK-8, Bradykinin oder Neurotensin.

Die Konzentrationen dieser Peptide müssen im nächsten Schritt in für den Energiehaushalt wichtigen Körperregionen, besonders im Fettgewebe und im Hypothalamus, bestimmt werden. Durch diese Werte – im Vergleich Knockout vs. Wildtyp – könnten Informationen über einen Mechanismus gewonnen werden, der letztlich zu dem übergewichtigen Phänotyp der NEP-Knockout-Mäuse führt. Möglicherweise wird dadurch sichtbar, in welche Regelkreise der Gewichtsregulation die NEP eingreift und in welcher Relation zu einander diese Regelkreise stehen.

IV - 4.7. Zusammenhang von NEP-Aktivität und Körpergewicht

Letztlich stellt sich die Frage nach einer Gewichtsabhängigkeit der NEP-Aktivität bei wildtypischen Mäusen und verallgemeinernd die Frage nach der Beeinflussbarkeit des Körpergewichts durch Modulation der NEP (Hemmung oder Aktivierung). Beiden Fragen wurde in unserer Arbeitsgruppe nachgegangen:

Zur Beantwortung der ersten Frage wurden zwei orientierende Experimente durchgeführt. Im ersten Versuch wurde keinerlei Beziehung der NEP-Aktivität im Hypothalamus (wildtypische Mäuse aus Gruppe 2) zum Körpergewicht festgestellt

(weder bei Auswertung nach Geschlecht oder Futter noch nach gemeinsamer Auswertung). NEP-Aktivität und Körpergewicht korrelierten nicht miteinander. In einem weiteren Versuch, in dem die NEP-Aktivität in Niere und Lunge eines normalgewichtigen Zuchtstammes (DUKsi) mit der eines stark übergewichtigen (DU6i) verglichen wurde (beide Mausstämme waren aus der gleichen Linie abgeleitet), wurde dagegen eine starke Abhängigkeit von der NEP-Aktivität beobachtet. In den genannten peripheren Organen der übergewichtigen Tiere war die NEP-Aktivität signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse sollen zukünftig an weiteren peripheren Organen und ZNS-Regionen von übergewichtigen Tierstämmen und ihren normalgewichtigen Kontrollen bestätigt sowie durch Messungen an humanem Material ergänzt werden.

Bei der Beantwortung der Frage nach dem Einfluss von NEP-Inhibitoren auf das Körpergewicht erzielte unsere Arbeitsgruppe bereits erste Erfolge: Während der oralen Behandlung von 22 wildtypischen männlichen C57BL6-Mäusen mit dem spezifischen NEP-Inhibitor Candoxatril (im Futter enthalten) war das Körpergewicht dieser Tiere bereits nach 10 Behandlungstagen gegenüber der Kontrollgruppe (n=21, mit einem Placebofutter behandelt) signifikant erhöht (persönliche Mitteilung von W.-E. Siems/FMP). Am 63. Behandlungstag betrug die Gewichts Differenz bereits 3,03 g ($33,88 \pm 0,56$ g bei Behandlung mit Placebo; $36,91 \pm 1,00$ g bei Behandlung mit Candoxatril; $P < 0,01$). Ebenso waren die abdominalen Fettmengen bei Versuchsende deutlich erhöht. Durch die Inhibition des Enzyms resultierte ein deutlich schnellerer Anstieg des Körpergewichts als durch die NEP-Defizienz bei den Knockout-Mäusen. Im Gegensatz zu den Versuchen an NEP-Knockout-Mäusen wurde bei den Candoxatril-behandelten Wildtypen eine signifikant erhöhte Futteraufnahme beobachtet ($110,1 \pm 2,18$ g/kg/d bei Behandlung mit Placebo; $122,1 \pm 3,50$ g/kg/d bei Behandlung mit Candoxatril; $P < 0,01$).

Die Ursachen für den schnelleren Gewichtsanstieg und die erhöhte Futteraufnahme bei den Candoxatril-behandelten Tieren gegenüber den NEP-defizienten sind noch unklar. Siems et al. hatten zwar gefunden, dass in den NEP-Knockout-Tieren verwandte Metallopeptidasen wie ACE und APN in wichtigen Hirnregionen nicht gegenreguliert sind [Siems, 00] – eine teilweise Substitution der NEP durch andere Peptidasen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden [vgl. auch Oliveri, 01]. Aber auch in den Candoxatril-behandelten Tieren kann eine Gegenregulation anderer

Peptidasen nicht ausgeschlossen werden [vgl. auch Helin, 94]. Weiterhin könnte zu dem schnelleren Gewichtsanstieg der Candoxatril-behandelten Tiere beigetragen haben, dass diese Tiere zu Versuchsbeginn 7 Monate alt waren, die rasche juvenile Gewichtszunahme also schon abgeschlossen war. Im Gegensatz dazu war bei den Knockouttieren das Enzym bereits vor der Geburt ausgeschaltet.

Besondere Aufmerksamkeit sollte finden, dass nach unseren Untersuchungen zur ZNS-Gängigkeit (siehe oben beschriebene Versuche zum Alkoholkonsum) das Candoxatril die Blut-Hirn-Schranke nicht überwindet. Die oben beschriebenen Effekte des Candoxatrils können also auf die Hemmung der peripheren NEP zurückgeführt werden. Nach Untersuchungen von Schling und Schäfer spielt das Renin-Angiotensin-System (und darin besonders die NEP) eine bedeutende Rolle im peripheren Fettgewebe [Schling, 02]. Im menschlichen Fettgewebe ist hauptsächlich die NEP für die Inaktivierung von Angiotensin II verantwortlich, welches für die Neubildung von Adipocyten und Präadipocyten verantwortlich ist [Engeli, 03]. Durch den Abbau von Angiotensin II könnte also die NEP eine regulierende Funktion auf die Adipogenese ausüben. Für diese Hypothese spricht auch, dass die Gewichtszunahme der NEP-Knockout-Tiere fast ausschließlich dem Fettgewebe zuzuschreiben ist und die NEP vor allem in *peripheren* Organen übergewichtiger Mäuse erhöht ist. Über den beschriebenen Mechanismus im Fettgewebe wäre auch der gewichtssteigernde Effekt des *peripher* wirksamen Candoxatril erklärbar.

Diese Ergebnisse zeigen auf der einen Seite die Gefahren auf, die in der therapeutischen Nutzung von NEP-Inhibitoren liegen können. Dass der gewichtssteigernde Effekt in Tierversuchen bisher jedoch nicht beobachtet wurde, kann sowohl an der kleinen Anzahl bisher durchgeführter Langzeitstudien liegen als auch an der geringeren Dosis bei diesen Experimenten (50 mg/kg/d bei Arnal et al. [Arnal, 01] im Gegensatz zu 200 mg/kg/d in unseren Versuchen). Beim Einsatz von NEP-Inhibitoren am Menschen (besonders bei der langfristigen Behandlung des Blutdrucks, der oft mit einem erhöhten Körpergewicht einhergeht) muss diese mögliche gewichtssteigernde Nebenwirkung in Betracht gezogen und in klinischen Studien abgeschätzt werden.

Unsere Ergebnisse wecken auf der anderen Seite aber auch die Hoffnung, dass Körpergewicht und Fettakkumulation durch eine Modulation der NEP-Aktivität gesteuert werden können. Diese Möglichkeit einer Induktion der NEP wurde zwar in

letzter Zeit – besonders im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung – häufiger diskutiert [Iwata, 05]. Die verstärkte Expression der NEP durch Transfer des Enzym-Gens in das Gehirn von Mäusen wurde zwar schon mehrfach erprobt [u. a. beschrieben in Marr, 03], und inzwischen gibt es vielfältige Ansätze zur experimentellen Induktion der NEP [u. a. durch Quercetin und Resveratrol in Melzig, 02; oder durch Grünteeextrakt in Melzig, 03]; noch fehlen aber realistische Behandlungsansätze.

Die viel versprechenden therapeutischen Chancen (u. a. Behandlung der Adipositas, der Alzheimerschen Erkrankung und der Alkoholkrankheit) erfordern jedoch neben Lösungen zur sicheren Induktion der NEP (welche sich auch lokal und zeitlich begrenzt steuern lassen muss) immer auch Risikoabschätzungen. So muss in jedem Fall beachtet werden, dass die Hemmung der NEP zu negativen Folgen u. a. für den Blutdruck, die Hämodynamik und die Natriurese führen kann. Und die NEP kann – wie in der Diskussion zum Alzheimer-Kapitel (II - 4) beschrieben – gerade im Alter einen protektiven Einfluss auf kognitive und Lernfähigkeiten ausüben. So entsteht das Bild eines vielseitigen und vielseitig nutzbaren, jedoch auch janusköpfigen Enzyms.

V.SCHLUSSBETRACHTUNG UND AUSBLICK

In den vorausgegangenen Kapiteln wurden Zusammenhänge zwischen NEP und verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nicht nur, einige der Wirkungen des Enzyms detailliert darzustellen und daraus Ansätze für künftige Therapien abzuleiten, sondern auch einen Überblick über die möglichen Interaktionen der involvierten Regulationssysteme im Wechselspiel mit der NEP zu geben und daraus letztlich auch das Für und Wider einer pharmakologischen Veränderung der NEP-Aktivität abzuschätzen. Darüber hinaus soll das Modell der NEP-Knockout-Maus als zukünftiges Forschungsobjekt für polyfaktorielle Erkrankungen diskutiert werden.

Aus den vielfältigen Funktionen des Enzyms ergeben sich Chancen, bestimmte pathologische Zustände oder Vorgänge pharmakologisch zu beeinflussen (z. B. Bluthochdruck, Adipositas, Alzheimersche Erkrankung). Daraus erwächst aber zugleich das Risiko einer unerwünschten Beeinflussung anderer Funktionen/Systeme. Es kommt erschwerend hinzu, dass – bis auf die Regulierung des Blutdrucks und der Natriurese – nach heutigem Kenntnisstand eine verminderte NEP-Aktivität zumeist negative Folgen hat (wie z. B. die vermehrte Akkumulation von A β bei der Alzheimerschen Erkrankung) oder sogar mit Krankheiten assoziiert ist. Dies schränkt die Verwendung von NEP-Inhibitoren stark ein.

In den letzten 10-15 Jahren sind mehrere potente spezifische NEP-Inhibitoren (z. B. Candoxatril) oder kombinierte Inhibitoren von NEP, ACE und/oder ECE (z. B. Omapatrilat) entwickelt worden, die bei verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt werden sollen. Bei langzeitiger Anwendung dieser Inhibitoren besteht schon aus theoretischen Überlegungen die Gefahr u. a. krankhafter Prostata-Veränderungen oder entzündlicher Lungen-Prozesse. Praktische Belege für diese Schlussfolgerungen wurden in den einzelnen Kapiteln bereits genannt, z. B. die Amyloidablagerung unter Behandlung mit den NEP-Inhibitoren Phosphoramidon und Thiorphan [Iwata, 00].

Bei einer künftigen Nutzung von NEP-Hemmern muss daher vorab zumindest geklärt sein, ob die Blut-Hirn-Schranke für solche Inhibitoren eine sichere Sperre ist. Für das Candoxatril scheint dies nach eigenen Experimenten (orale Applikation, auch mit hohen Dosen) gesichert zu sein (persönliche Mitteilung von W.-E. Siems/FMP), jedoch stehen Untersuchungen zur Dauerapplikation noch aus. Allerdings birgt auch eine periphere Hemmung der NEP Gefahren, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde: Unter Behandlung mit Candoxatril wurde ein erhöhter Alkoholkonsum beobachtet. Darüber hinaus wurde durch unsere Arbeitsgruppe der tierexperimentelle Nachweis erbracht, dass unter mehrwöchiger Behandlung mit Candoxatril das Körpergewicht zunimmt und zusätzlich Körperfett akkumuliert wird (persönliche Mitteilung von W.-E. Siems/FMP). All diese Befunde müssen in der Nutzen-Risiko-Abwägung beim Einsatz – besonders beim langfristigen Einsatz – von NEP-Inhibitoren beachtet werden.

Aus diesen Gründen wäre es für verschiedene Therapiefelder wünschenswert, die NEP nicht zu hemmen, sondern ihre Aktivität zu erhöhen. Gerade in Bezug auf die Alzheimersche Erkrankung wurden bereits dahingehende Überlegungen angestellt [diskutiert u. a. in Iwata, 05]. Die gentechnischen Ansätze zur Erhöhung der NEP-Aktivität bei Mäusen unter Nutzung von Lentiviren als Genfähren [Marr, 03] sind sicher kein praktikabler Weg als Therapieformen der näheren Zukunft. Obwohl die Effekte noch vergleichsweise gering sind bietet die Induktion der NEP-Aktivität an Zellmodellen durch Somatostatin [Saito, 05] bzw. durch Quercetin, Resveratrol oder Grünteeextrakt [Melzig, 02; Melzig, 03] viel versprechende Ansatzpunkte für spätere Arzneimittelentwicklungen. In letzterem Zusammenhang ist besonders bemerkenswert, dass Klaus et al. bei übergewichtigen Mäusen eine Reduktion des Körpergewichtes durch die regelmäßige Gabe von Epigallocatechinen beobachteten, welche in großem Maße in Grünteeextrakt vorkommen [Klaus, 05].

In den letzten Jahren ist aus wissenschaftlicher Perspektive, aber auch aus zeitkritischer Sicht intensiv über so genannte „hedonistische Erkrankungen“ diskutiert worden, wie sie z. B. die Alkoholkrankheit und krankhaftes Übergewicht darstellen. Diese hedonistischen Erkrankungen sind gekennzeichnet durch einen krankhaft erhöhten Verbrauch von Genussmitteln. Durch das Bekanntwerden neuer Peptide nahm das Verständnis über deren Zusammenhang auf molekularer Ebene zu. Es

wurden inzwischen zahlreiche Peptide gefunden, die sowohl in die Alkoholkrankheit als auch in die Adipositas involviert sein können, z. B. die Enkephaline, NPY, die Melanocortine oder Galanin [zusammenfassend dargestellt in Thiele, 03]. Da die NEP am Abbau eines Großteils dieser Peptide essentiell beteiligt ist, ist es denkbar, dass bei Beeinflussung der NEP sowohl der Alkoholkonsum als auch das Körpergewicht und möglicherweise noch andere „hedonistisch“ geprägte Prozesse/Zustände verändert werden können. Die vorliegende Arbeit ergänzt diesen postulierten Zusammenhang durch experimentelle Befunde. Bei NEP-Knockout-Mäusen wurde sowohl ein erhöhter Alkoholkonsum (nach Stressexposition) als auch ein erhöhtes Körpergewicht mit beträchtlichen abdominalen Fetteinlagerungen demonstriert. Beide Funde zusammen geben eine Vorstellung von der zentralen Rolle, die die NEP – mittelbar über ihre Substrate – innerhalb dieser Zustände einnehmen kann.

Der Eindruck einer „Janusköpfigkeit“ der NEP lässt sich auch aus einem weiteren Befund unserer Arbeitsgruppe gewinnen. Wie in Kap. II - 4.1 beschrieben, waren sehr alte NEP-Knockout-Mäuse (21 Monate) in Verhaltenstests zur Bestimmung der Lern- und Gedächtnisleistung ihren wildtypischen Altersgenossen deutlich überlegen und schnitten auch in elektrophysiologischen Experimenten (LTP) besser ab [Walther, 05]. Dieses unerwartete Ergebnis steht in Widerspruch zu der Theorie, dass die erhöhten A β -Konzentrationen in den Knockout-Mäusen die Lern- und Gedächtnisleistung nachhaltig verschlechtern. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür zeigt überraschenderweise eine Verbindung zu Alkoholabusus und Übergewicht: Da solche NEP-Substrate wie vor allem GLP-1 und Galanin nicht nur auf die Alkohol- bzw. Nahrungsaufnahme wirken, sondern auch einen positiven Einfluss auf Lern- und Gedächtnisleistung haben [During, 03; Jacobowitz, 04], kommen sie als Mediatoren unseres tierexperimentellen Befundes in Frage.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Eignung des verwendeten Tiermodells für die Erforschung komplexer polyfaktorieller Erkrankungen, wie sie die Fett- und die Alkoholsucht darstellen. Mit diesem Tiermodell ist es zwar kaum möglich, genetisch bedingte Extremfälle dieser Erkrankungen zu erforschen. Andererseits eignet es sich vielleicht, um den polygenetischen Gesamtprozess zu verstehen, der letztendlich zu dem „Normalfall“ des Krankheitsbildes führt. Bei Verständnis dieses Gesamtprozesses erschließt sich womöglich ein besserer, höher

angesiedelter Angriffspunkt im Körper, durch dessen Beeinflussung sich ein weniger starker, dafür aber lang anhaltender Effekt erreichen lässt. Ein solches höher angesiedeltes Target bzw. eine übergeordnete Schaltstelle könnte die NEP darstellen, da sie nicht nur ein spezifisches Substrat abbaut, sondern über den Abbau einer Vielzahl stoffwechselrelevanter Peptide in die verschiedenen Regelkreise der Gewichtsregulation eingreifen kann. Unsere Versuche zum Alkoholkonsum und besonders zur Fettleibigkeit legen eine solche höhere, nach mehreren Seiten agierende Regelfunktion auch experimentell nahe, da der pathologische Phänotyp nicht wie bei monofaktoriellen Tiermodellen bereits bei sehr jungen Tieren stark ausgeprägt ist, sondern erst nach mehreren Monaten oder nach zusätzlichen Einflüssen, wie z. B. Stresssituationen, sichtbar wird.

Das Tiermodell der NEP-Knockout-Maus entspricht mehr der menschlichen, überwiegend polyfaktoriellen Adipositas, die nur in seltenen Fällen so stark ausgeprägt ist wie bei den bekannten monofaktoriellen Tiermodellen. Bei den monofaktoriellen Modellen handelt es sich zumeist um Tiere mit Veränderungen in *anorexigenen* Peptidhormonen, deren Vorläuferstufen oder Rezeptoren. Im Fall der veränderten (defizienten oder defekten) Peptide konnten an solchen Tiermodellen durch Substitution dieser Peptide eindrucksvolle Reduktionen des erhöhten Körpergewichtes gezeigt werden. Ein anderes Versuchsmodell stellt die Verabreichung *orexigener* Peptidhormone dar, die zu einer schnellen und starken Gewichtszunahme führen. Bei gleichzeitiger Gabe von deren Antagonisten trat der erwartete Effekt einer raschen Gewichtsabnahme ein. Wenn allerdings die anorexigenen Peptide bzw. Antagonisten orexigener Peptiden „normal“ übergewichtigen Tieren oder sogar Menschen verabreicht wurden, blieb der erwartete nachhaltige Erfolg aus. Besonders eindrucksvoll ist das am Beispiel des Leptin zu sehen, das nach seiner Entdeckung in der Presse zunächst als „Schlankkeitshormon“ gepriesen wurde. Wenn dieses Protein an adipösen Probanden getestet wurde, war es dagegen nahezu wirkungslos [North, 99]. Lediglich bei extrem übergewichtigen Kindern mit einer seltenen angeborenen Leptin-Mutation kam es zu dem gewünschten Effekt einer Gewichtsreduktion [Farooqi, 02].

Diese Fälle belegen noch einmal das hoch effektive körpereigene Regelsystem zur Erhaltung eines einmal erreichten Gewichtes. Bei Versagen oder Beeinflussung

eines Regelkreises (z. B. durch spezifische Peptide oder deren Antagonisten) können ein oder mehrere andere Regelkreise diesen Ausfall kompensieren. Erst wenn mehrere dieser Systeme effektiv und über längere Zeit gehemmt werden können (z. B. über die Enzyme, welche die beteiligten Peptidhormone abbauen) ist ein langsamer, aber nachhaltiger Rückgang des Körpergewichtes zu erwarten. Nicht nur für die NEP ist solch ein Verhalten vorstellbar, auch verwandte Peptidhormon–katabolisierende oder –anabolisierende Enzyme wie z. B. die Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) oder die CPE stellen solche Kandidaten dar. In dieses Bild passt auch die in Kap. 0 beschriebene Mutation im CPE-Gen, die bei der CPE-(*fat*)-Maus zu einem ähnlichen adipösen Phänotyp wie dem der NEP-Knockout-Maus führt.

Wie aus den in den verschiedenen Kapiteln vorgestellten Erkrankungen hervorgeht, ist eine verminderte Aktivität der NEP oder sogar deren vollständiges Fehlen vorwiegend mit negativen Folgen für die Gesundheit assoziiert. Aus diesem Grund wäre es von größter Bedeutung, einen effektiven Mechanismus zur Induktion des Enzyms (möglichst mit gezielter Kompartimentierung) zu finden. Darauf basierende Pharmaka könnten in der Folge in Tierexperimenten einen Einfluss auf die genannten Krankheiten bestätigen und letztendlich zu einer verbesserten Therapie solcher Erkrankungen wie der Alzheimerschen Erkrankung, der Alkoholkrankheit oder der Adipositas beitragen.

VI. SYNOPSIS

1. Untersuchungen zur Alzheimerschen Erkrankung:

- Murines A β (4–15) (mA β (4–15)) wurde durch lösliche bovine NEP nach 5h um 9% stärker abgebaut als die humane Form (hA β (4–15)).
- mA β (1–42) wurde durch rekombinante humane NEP nach 2,75h um >20% stärker abgebaut als hA β (1–42).
- Eine Untersuchung der entstehenden Spaltprodukte mittels MS ergab:
 - a) Sowohl bei mA β (4–15) als auch bei hA β (4–15) wurden über die erwarteten Fragmente (Spaltung bei Gly^9-Phe^{10} bzw. Gly^9-Tyr^{10}) hinaus keine weiteren Bruchstücke detektiert.
 - b) Die aus der Literatur bekannten Spaltstellen Glu^3-Phe^4 , Gly^9-Tyr^{10} , $Phe^{19}-Phe^{20}$, $Ala^{30}-Ile^{31}$ und $Gly^{33}-Leu^{34}$ konnten an hA β (1–42) bestätigt werden. Als weitere hauptsächliche katalytische Angriffspunkte wurden hier $Glu^{11}-Val^{12}$, $Leu^{17}-Val^{18}$ sowie $Gly^{38}-Val^{39}$ ermittelt.
 - c) Diese Spaltsequenzen wurden auch beim murinen Peptid erhalten, wobei die Spaltungen bei $Ala^{30}-Ile^{31}$ und $Gly^{33}-Leu^{34}$ weniger stark ausgeprägt waren. Die Bindung $Lys^{16}-Leu^{17}$ dagegen wurde nur beim murinen Peptid in größerem Maße gespalten.
- Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von humanem und murinem A β (1–42) konnte bei mA β (1–42) im Gegensatz zum hA β (1–42) keine Fibrillenbildung beobachtet werden.

2. Untersuchungen zum Alkoholkonsum

- Unter stressarmen Bedingungen ergaben sich zwischen den beiden Mausstämmen (NEP (–/–) bzw. Wildtyp) keine Unterschiede in deren Alkoholtrinkverhalten.

- Auf die Induktion eines kurzzeitigen sozialen Stresses folgte nach einer kurzen Übergangsphase ein sprunghafter Anstieg des Alkoholkonsums der Knockoutmäuse für ca. 3 Wochen; danach glichen sich Knockout- und Wildtypiere wieder an.
- In einem weiteren Stress-Paradigma (modifizierter Intruder-Test) kam es zunächst ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg des Alkoholkonsums für ca. 3 Wochen. Nach Angleichung und erneutem Stress (an den gleichen Tieren) folgte für ca. 2,5 Monate ein stark erhöhter Alkoholkonsum (bis Versuchsende).
- Eine geschmackliche Präferenz eines der beiden Genotypen sowie eine veränderte Alkoholabbau-Kinetik konnten ausgeschlossen werden. Dagegen wurde bei den Knockouttieren eine erhöhte Gesamttrinkmenge beobachtet.
- Der *In-vitro*-Abbau von Enkephalinen in Hirnmembran-Präparationen von Knockoutmäusen verlief z. T. schneller als bei den Wildtypen. Auf eine Naltrexongabe *in vivo* sprachen beide Genotypen jedoch nicht an.
- Bei Verabreichung eines oral wirksamen NEP-Inhibitors (Candoxatril) an einem Teil von Wildtypieren tranken diese signifikant mehr Alkohol als die unbehandelten. Im Gegensatz zur peripheren NEP (Niere) dieser Tiere konnte im ZNS keine Reduktion der NEP-Aktivität nachgewiesen werden.

3. Untersuchungen zum Übergewicht

- An NEP-Knockout-Mäusen wurde ein spät einsetzender Typ der Adipositas mit großen abdominalen Fettansammlungen beobachtet. Durch NMR-Analyse wurde bestätigt, dass der Gewichtszuwachs der Knockouttiere zum größten Teil auf den Anstieg der Fettmassen zurückzuführen ist; die Muskelmasse der Tiere trug dagegen sehr wenig zu dem Anstieg bei.
- Die Vermutung eines Einflusses der verwendeten Futtersorte wurde bestätigt: Sowohl bei Fütterung mit extrudiertem als auch mit fettreichem Futter traten die Unterschiede zwischen den Genotypen deutlich früher auf und waren die Gewichtsunterschiede größer als bei pelletiertem (Standard-)Futter.

- Ein erhöhter Futterverbrauch der untersuchten Knockoutmäuse konnte nicht bewiesen werden, ist jedoch nicht einwandfrei auszuschließen.
- Die Genotypen wiesen bei diversen Organgewichten keine Unterschiede auf; die Fettmassen zeigten dagegen eine zu den Körpergewichten der verschiedenen Untergruppen analoge Gewichtsverteilung auf.
- Die Glucose-, Keton- und Lipid-Werte aus dem Blut/Serum dieser Tiere zeigten bei den Knockoutgruppen keinerlei Anzeichen für erhöhte Werte; bei Gesamtcholesterol, HDL und (eingeschränkt) bei Triglyceriden wurden sogar tendenziell erniedrigte Werte festgestellt.
- Der Orale Glucosetoleranz-Test an nüchternen Tieren ergab eine verschlechterte Glucosetoleranz der NEP-Knockout-Mäuse (sowohl Männchen als auch Weibchen).
- Bei der Untersuchung der Serum-Leptinkonzentrationen dieser Tiere wurde eine starke Abhängigkeit vom Körpergewicht, jedoch nicht vom Genotyp gefunden.
- Die Untersuchung des Respiratorischen Quotienten und der produzierten Wärmemenge ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyptieren.
- Für eine Korrelation des Körpergewichtes mit der NEP-Aktivität des Hypothalamus unterschiedlich schwerer C57BL6-Wildtypiere wurden keine Hinweise gefunden. Dagegen wurde eine erniedrigte NEP-Aktivität in Lunge und Niere eines schweren Zuchtstammes festgestellt.
- Auf der Suche nach einem molekularen Mediator für das Übergewicht der NEP-Knockout-Mäuse wurde erstmals die Hydrolyse von Galanin durch die NEP (in vitro und in vivo) gezeigt und per Massenspektrometrie ein Spaltmuster beschrieben.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahima, R. S. und Flier, J. S. (2000): Adipose tissue as an endocrine organ, *Trends Endocrinol Metab* 11 [8], Seite 327-332.
- Albiston, A. L.; McDowall, S. G.; Matsacos, D.; Sim, P.; Clune, E.; Mustafa, T.; Lee, J.; Mendelsohn, F. A.; Simpson, R. J.; Connolly, L. M. und Chai, S. Y. (2001): Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase, *J Biol Chem.* 276 [52], Seite 48623-48626.
- Allison, D. B.; Fontaine, K. R.; Manson, J. E.; Stevens, J. und VanItallie, T. B. (1999): Annual deaths attributable to obesity in the United States, *JAMA* 282 [16], Seite 1530-1538.
- Alzheimer, Alois (1906): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Zentralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie* 30, Seite 177-179.
- Arnal, J. F.; Castano, C.; Maupas, E.; Mugniot, A.; Darblade, B.; Gourdy, P.; Michel, J. B. und Bayard, F. (2001): Omapatrilat, a dual angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitor, prevents fatty streak deposit in apolipoprotein E-deficient mice, *Atherosclerosis* 155 [2], Seite 291-295.
- Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E. und Bush, A. I. (1998): Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis, *J Biol Chem.* 273 [21], Seite 12817-12826.
- Aust, L; Dongowski, G; Frenz, U; Täufel, A und Noack, R (2001): Estimation of available energy of dietary fibres by indirect calorimetry in rats, *Eur.J Nutr.* 40, Seite 23-29.
- Backstrom, J. R.; Lim, G. P.; Cullen, M. J. und Tokes, Z. A. (1996): Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40), *J Neurosci.* 16 [24], Seite 7910-7919.
- Bado, A.; Roze, C.; Lewin, M. J. und Dubrasquet, M. (1989): Endogenous opioid peptides in the control of food intake in cats, *Peptides* 10 [5], Seite 967-971.
- Bae, S. J.; Matsunaga, Y.; Takenaka, M.; Tanaka, Y.; Hamazaki, Y.; Shimizu, K. und Katayama, I. (2002): Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts, *Int.Arch.Allergy Immunol.* 127 [4], Seite 316-321.
- Barker, P. E.; Shipp, M. A.; D'Adamio, L.; Masteller, E. L. und Reinherz, E. L. (1989): The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27), *J Immunol.* 142 [1], Seite 283-287.
- Barnes, K.; Matsas, R.; Hooper, N. M.; Turner, A. J. und Kenny, A. J. (1988): Endopeptidase-24.11 is striosomally ordered in pig brain and, in contrast to aminopeptidase N and peptidyl dipeptidase A ('angiotensin converting enzyme'), is a marker for a set of striatal efferent fibres, *Neuroscience* 27 [3], Seite 799-817.
- Barnes, K.; Turner, A. J. und Kenny, A. J. (1993): An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows co-localization of endopeptidase-24.11 with substance P, *Neuroscience* 53 [4], Seite 1073-1082.

- Barsh, G. S.; Farooqi, I. S. und O'Rahilly, S. (2000): Genetics of body-weight regulation, *Nature* 404 [6778], Seite 644-651.
- Beliaev, N. A.; Brusov, O. S. und Panchenko, L. F. (1983b): [Effect of chronic alcohol consumption on activity of enkephalinase A in rat striatum, hypothalamus and midbrain], *Vopr.Med.Khim.* 29 [1], Seite 102-107. URL: PM:6340337
- Beliaev, N. A.; Brusov, O. S. und Panchenko, L. F. (1983a): [Effect of chronic alcohol consumption on activity of enkephalinase A in rat striatum, hypothalamus and midbrain], *Vopr.Med.Khim.* 29 [1], Seite 102-107. URL: PM:6340337
- Bergmann, KE und Mensink, GB (1999): Körpermaße und Übergewicht, *Gesundheitswesen* 61, Seite S115-S120.
- Berman, Yemiliya; Mzhavia, Nino; Polonskaia, Ann und Devi, Lakshmi A. (2001): Impaired Prohormone Convertases in Cpefat/Cpefat Mice, *Journal of Biological Chemistry* 276 [2], Seite 1466-1473.
- Beyreuther, Konrad (1999): Alzheimersche Krankheit - Molekulares Verständnis und therapeutische Implikationen, <http://www.fes.de/fulltext/asfo/00234toc.htm>.
- Bitan, G.; Kirkitadze, M. D.; Lomakin, A.; Vollers, S. S.; Benedek, G. B. und Teplow, D. B. (2003a): Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 [1], Seite 330-335.
- Bitan, Gal; Kirkitadze, Marina D.; Lomakin, Aleksey; Vollers, Sabrina S.; Benedek, George B. und Teplow, David B. (2003b): Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 [1], Seite 330-335.
- Blum, K.; Trachtenberg, M. C.; Elliott, C. E.; Dingler, M. L.; Sexton, R. L.; Samuels, A. I. und Cataldie, L. (1988): Enkephalinase inhibition and precursor amino acid loading improves inpatient treatment of alcohol and polydrug abusers: double-blind placebo-controlled study of the nutritional adjunct SAAVE, *Alcohol* 5 [6], Seite 481-493.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem* 72, Seite 248-254.
- Brady, K. T. und Sonne, S. C. (1999): The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse, *Alcohol Res.Health* 23 [4], Seite 263-271.
- Brzyska, M.; Bacia, A. und Elbaum, D. (2001): Oxidative and hydrolytic properties of beta-amyloid, *Eur.J Biochem* 268 [12], Seite 3443-3454.
- Bucciantini, M.; Giannoni, E.; Chiti, F.; Baroni, F.; Formigli, L.; Zurdo, J.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Dobson, C. M. und Stefani, M. (2002): Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases, *Nature* 416 [6880], Seite 507-511.
- Buenger, L.; Herrendoerfer, G. und Renne, U. (1990): Results of long term-selection for growth traits in laboratory mice., *Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* 13, Seite 321-324.
- Bundesministerium für Gesundheit und Soziale Sicherung (2000): Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen in Deutschland, *Schriftenreihe des BMG* [128].
- Bundesregierung (1996): Situation der Demenzkranken in der Bundesrepublik Deutschland, *Deutscher Bundestag Drucksache* 13/5257 13/5257.

- Bush, A. I.; Pettingell, W. H.; Multhaup, G.; Paradis, M.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L. und Tanzi, R. E. (1994): Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc, *Science* 265 [5177], Seite 1464-1467.
- Carpentier, M.; Robitaille, Y.; DesGroseillers, L.; Boileau, G. und Marcinkiewicz, M. (2002): Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy, *J Neuropathol.Exp Neurol.* 61 [10], Seite 849-856.
- Carson, J. A. und Turner, A. J. (2002): Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?, *J Neurochem* 81 [1], Seite 1-8.
- Chen, H.; Charlat, O.; Tartaglia, L. A.; Woolf, E. A.; Weng, X.; Ellis, S. J.; Lakey, N. D.; Culpepper, J.; Moore, K. J.; Breitbart, R. E.; Duyk, G. M.; Tepper, R. I. und Morgenstern, J. P. (1996): Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice, *Cell* 84 [3], Seite 491-495.
- Clarimon, J.; Munoz, F. J.; Boada, M.; Tarraga, L.; Sunyer, J.; Bertranpetit, J. und Comas, D. (2003): Possible increased risk for Alzheimer's disease associated with neprilysin gene, *J Neural Transm.* 110 [6], Seite 651-657.
- Connelly, J. C.; Skidgel, R. A.; Schulz, W. W.; Johnson, A. R. und Erdos, E. G. (1985): Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82 [24], Seite 8737-8741.
- Cowen, Michael S.; Chen, Feng und Lawrence, Andrew J. (2004): Neuropeptides: implications for alcoholism, *Journal of Neurochemistry* 89 [2], Seite 273-285.
- Crabbe, J. C. (2002): Genetic contributions to addiction, *Annu.Rev.Psychol.* 53, Seite 435-462.
- Crabbe, John C.; Wahlsten, Douglas und Dudek, Bruce C. (1999): Genetics of Mouse Behavior: Interactions with Laboratory Environment, *Science* 284 [5420], Seite 1670-1672.
- Curtain, C. C.; Ali, F.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Norton, R. S.; Beyreuther, K.; Barrow, C. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. und Barnham, K. J. (2001): Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits, *J Biol Chem.* 276 [23], Seite 20466-20473.
- D'Adamio, L.; Shipp, M. A.; Masteller, E. L. und Reinherz, E. L. (1989): Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 [18], Seite 7103-7107.
- d'Uscio, L. V.; Quaschnig, T.; Burnett, J. C., Jr. und Luscher, T. F. (2001): Vasoepitidase Inhibition Prevents Endothelial Dysfunction of Resistance Arteries in Salt-Sensitive Hypertension in Comparison With Single ACE Inhibition, *Hypertension* 37 [1], Seite 28-33.
- DeMattos, R. B.; Bales, K. R.; Cummins, D. J.; Paul, S. M. und Holtzman, D. M. (2002): Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease, *Science* 295 [5563], Seite 2264-2267.
- Devault, A.; Lazure, C.; Nault, C.; Le Moual, H.; Seidah, N. G.; Chretien, M.; Kahn, P.; Powell, J.; Mallet, J.; Beaumont, A.; Roques, B. P.; Crine, P. und Boileau, G. (1987): Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11

(enkephalinase) deduced from a complementary DNA, EMBO J 6 [5], Seite 1317-1322.

Dion, N.; Cohen, P.; Crine, P. und Boileau, G. (1997): Characterisation of neprilysin (EC 3.4.24.11) S2' subsite, FEBS Lett. 411 [1], Seite 140-144.

Duhl, D. M.; Vrieling, H.; Miller, K. A.; Wolff, G. L. und Barsh, G. S. (1994): Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice, Nat Genet. 8 [1], Seite 59-65.

During, M. J.; Cao, L.; Zuzga, D. S.; Francis, J. S.; Fitzsimons, H. L.; Jiao, X.; Bland, R. J.; Klugmann, M.; Banks, W. A.; Drucker, D. J. und Haile, C. N. (2003): Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection, Nat Med 9 [9], Seite 1173-1179.

Eckman, E. A.; Reed, D. K. und Eckman, C. B. (2001): Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme, J Biol Chem. 276 [27], Seite 24540-24548.

Engeli, S.; Schling, P.; Gorzelniak, K.; Boschmann, M.; Janke, J.; Ailhaud, G.; Teboul, M.; Massiera, F. und Sharma, A. M. (2003): The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?, Int.J Biochem Cell Biol 35 [6], Seite 807-825.

Enoch, MA (2003): Pharmacogenomics of alcohol response and addiction, Am J Pharmacogenomics 3 [4], Seite 217-232.

Esteban, J. A. (2004): Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide, Trends Neurosci. 27 [1], Seite 1-3.

Farooqi, I. S.; Matarese, G.; Lord, G. M.; Keogh, J. M.; Lawrence, E.; Agwu, C.; Sanna, V.; Jebb, S. A.; Perna, F.; Fontana, S.; Lechler, R. I.; DePaoli, A. M. und O'Rahilly, S. (2002): Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency, J Clin Invest 110 [8], Seite 1093-1103.

Fezoui, Y.; Hartley, D. M.; Harper, J. D.; Khurana, R.; Walsh, D. M.; Condron, M. M.; Selkoe, D. J.; Lansbury, P. T.; Fink, A. L. und Teplow, D. B. (2000): An improved method of preparing the amyloid beta-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments, Amyloid 7 [3], Seite 166-178.

Findlay, G. S.; Wick, M. J.; Mascia, M. P.; Wallace, D.; Miller, G. W.; Harris, R. A. und Blednov, Y. A. (2002): Transgenic expression of a mutant glycine receptor decreases alcohol sensitivity of mice, J Pharmacol. Exp Ther. 300 [2], Seite 526-534.

Francis, R.; McGrath, G.; Zhang, J.; Ruddy, D. A.; Sym, M.; Apfeld, J.; Nicoll, M.; Maxwell, M.; Hai, B.; Ellis, M. C.; Parks, A. L.; Xu, W.; Li, J.; Gurney, M.; Myers, R. L.; Himes, C. S.; Hiebsch, R.; Ruble, C.; Nye, J. S. und Curtis, D. (2002): aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation, Dev Cell 3 [1], Seite 85-97.

Fraser, P. E.; Nguyen, J. T.; Inouye, H.; Surewicz, W. K.; Selkoe, D. J.; Podlisny, M. B. und Kirschner, D. A. (1992): Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid beta-protein, Biochemistry 31 [44], Seite 10716-10723.

Frette, Catherine; Pezet, Sophie; El Nabout, Rita Azzi; Bertrand, Jean-Pierre; Pham, Quang Thieu; Kauffmann, Francine und Lafuma, Chantal (1998): Relationship of serum neutral endopeptidase E.C.3.4.24.11 activity to alcohol consumption, Alcohol Clin Exp Res 22 [7], Seite 1405-1408.

- Fricker, L. D.; Berman, Y. L.; Leiter, E. H. und Devi, L. A. (1996): Carboxypeptidase E activity is deficient in mice with the fat mutation. Effect on peptide processing, *J Biol Chem.* 271 [48], Seite 30619-30624.
- Friedland, J. und Silverstein, E. (1976): A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme, *Am J Clin Pathol* 66 [2], Seite 416-424.
- Fulcher, I. S. und Kenny, A. J. (1983): Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic forms of endopeptidase purified from pig kidneys, *Biochem J* 211 [3], Seite 743-753.
- GeneCards (2004): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=4311#map>.
- George, S. R.; Roldan, L.; Lui, A. und Naranjo, C. A. (1991): Endogenous opioids are involved in the genetically determined high preference for ethanol consumption, *Alcohol Clin Exp Res* 15 [4], Seite 668-672.
- Gianoulakis, C. (2004): Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse, *Curr.Top.Med.Chem.* 4 [1], Seite 39-50. URL: PM:14754375
- Glennner, G. G. und Wong, C. W. (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem Biophys.Res Commun.* 120 [3], Seite 885-890.
- Gordon, H. W. (2002): Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse, *Psychoneuroendocrinology* 27 [1-2], Seite 115-126.
- Grupp, L. A. (1992a): Effects of angiotensin II and an angiotensin converting enzyme inhibitor on alcohol intake in P and NP rats, *Pharmacol.Biochem Behav.* 41 [1], Seite 105-108.
- Grupp, L. A. und Chow, S. Y. (1992b): Time-dependent effect of the angiotensin converting enzyme inhibitor, abutapril, on voluntary alcohol intake in the rat, *Alcohol* 27 [3], Seite 267-271.
- Gulpinar, M. A. und Yegen, B. C. (2004): The physiology of learning and memory: role of peptides and stress, *Curr.Protein Pept.Sci.* 5 [6], Seite 457-473.
- Haemmerle, G.; Zimmermann, R.; Hayn, M.; Theussl, C.; Waeg, G.; Wagner, E.; Sattler, W.; Magin, T. M.; Wagner, E. F. und Zechner, R. (2002): Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis, *J Biol Chem.* 277 [7], Seite 4806-4815.
- Hama, E.; Shirotani, K.; Masumoto, H.; Sekine-Aizawa, Y.; Aizawa, H. und Saido, T. C. (2001): Clearance of extracellular and cell-associated amyloid beta peptide through viral expression of neprilysin in primary neurons, *Journal of Biochemistry* 130 [6], Seite 721-726.
- Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 [5580], Seite 353-356.
- Heimann, A. S.; Favarato, M. H.; Gozzo, F. C.; Rioli, V.; Carreno, F. R.; Eberlin, M. N.; Ferro, E. S.; Krege, J. H. und Krieger, J. E. (2004): ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight, *Physiol Genomics*.
- Helin, K.; Tikkanen, I.; Hohenthal, U. und Fyhrquist, F. (1994): Inhibition of either angiotensin-converting enzyme or neutral endopeptidase induces both enzymes, *Eur.J Pharmacol.* 264 [2], Seite 135-141.

Herpertz, S (2003): Psychotherapie der Adipositas, Dtsch Arztebl 100 [20], Seite A1367-A1373.

Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, J.; Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1991): Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid beta A4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4, Eur.J Biochem 201 [1], Seite 61-69.

Hill, J. O.; Wyatt, H. R.; Reed, G. W. und Peters, J. C. (2003): Obesity and the environment: where do we go from here?, Science 299 [5608], Seite 853-855.

Hirsch, J.; Leibel, R. L. und Chua, S. C. (1992): A clinical perspective on peptides and food intake, Am J Clin Nutr. 55 [1 Suppl], Seite 296S-298S. URL: PM:1728843

Howell, S.; Nalbantoglu, J. und Crine, P. (1995): Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism, Peptides 16 [4], Seite 647-652.

Hu, J.; Igarashi, A.; Kamata, M. und Nakagawa, H. (2001): Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity, J Biol Chem. 276 [51], Seite 47863-47868.

Huang, X.; Cuajungco, M. P.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. A.; Tyndall, J. D.; Hanson, G. R.; Stokes, K. C.; Leopold, M.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; Scarpa, R. C.; Saunders, A. J.; Lim, J.; Moir, R. D.; Glabe, C.; Bowden, E. F.; Masters, C. L.; Fairlie, D. P.; Tanzi, R. E. und Bush, A. I. (1999): Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction, J Biol Chem. 274 [52], Seite 37111-37116.

Hulme, E. C. (1992): Receptor preparations for binding studies, Hulme, E. C., Receptor--Ligand Interactions, a Practical Approach , IRL Press.

Hupe-Sodmann, K.; Goke, R.; Goke, B.; Thole, H. H.; Zimmermann, B.; Voigt, K. und McGregor, G. P. (1997): Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1 (7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells, Peptides 18 [5], Seite 625-632.

Hwang, B. H.; Stewart, R.; Zhang, J. K.; Lumeng, L. und Li, T. K. (2004): Corticotropin-releasing factor gene expression is down-regulated in the central nucleus of the amygdala of alcohol-preferring rats which exhibit high anxiety: a comparison between rat lines selectively bred for high and low alcohol preference, Brain Res 1026 [1], Seite 143-150.

Iwata, N.; Takaki, Y.; Fukami, S.; Tsubuki, S. und Saido, T. C. (2002): Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging, J Neurosci.Res 70 [3], Seite 493-500.

Iwata, N.; Tsubuki, S.; Takaki, Y.; Shirotani, K.; Lu, B.; Gerard, N. P.; Gerard, C.; Hama, E.; Lee, H. J. und Saido, T. C. (2001): Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin, Science 292 [5521], Seite 1550-1552.

Iwata, N.; Tsubuki, S.; Takaki, Y.; Watanabe, K.; Sekiguchi, M.; Hosoki, E.; Kawashima-Morishima, M.; Lee, H. J.; Hama, E.; Sekine-Aizawa, Y. und Saido, T. C. (2000): Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition, Nat Med. 6 [2], Seite 143-150.

Iwata, Nobuhisa; Higuchi, Makoto und Saido, Takaomi C. (2005): Metabolism of amyloid beta peptide and Alzheimer's disease, Pharmacol.Thera. 108 [2], Seite 129-148.

Iwata, Nobuhisa; Mizukami, Hiroaki; Shirotani, Keiro; Takaki, Yoshie; Muramatsu, Shin ichi; Lu, Bao; Gerard, Norma P.; Gerard, Craig; Ozawa, Keiya und Saido, Takaomi C. (2004): Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- β Peptide in Mouse Brain, *Journal of Neuroscience* 24 [4], Seite 991-998.

Jacobowitz, David M.; Kresse, Adelheid und Skofitsch, Gerhard (2004): Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography--a historical review*1, *Peptides* 25 [3], Seite 433-464.

Janek, K.; Rothmund, S.; Gast, K.; Beyermann, M.; Zipper, J.; Fabian, H.; Bienert, M. und Krause, E. (2001): Study of the conformational transition of A β (1-42) using D-amino acid replacement analogues, *Biochemistry* 40 [18], Seite 5457-5463.

Jansen, S. (2004): Welt-Alzheimerstag, *Pharm.Ztg.* 149 [38], Seite 46-46.

Johnstone, E. M.; Chaney, M. O.; Norris, F. H.; Pascual, R. und Little, S. P. (1991): Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis, *Brain Res Mol. Brain Res* 10 [4], Seite 299-305.

Kenny, A. J. (1977): Proteinases associated with cell membranes, Barrett, A. J., *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, Seite 393-444, Elsevier, Amsterdam.

Kenny, A. J. und Stephenson, S. L. (1988): Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide, *FEBS Lett.* 232 [1], Seite 1-8.

Kerr, M. A. und Kenny, A. J. (1974): The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border, *Biochem J* 137 [3], Seite 477-488.

Klaus, S.; Pultz, S.; Thone-Reineke, C. und Wolfram, S. (2005): Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation, *Int.J Obesity* 29, Seite 615-623.

Kleyn, P. W.; Fan, W.; Kovats, S. G.; Lee, J. J.; Pulido, J. C.; Wu, Y.; Berkemeier, L. R.; Misumi, D. J.; Holmgren, L.; Charlat, O.; Woolf, E. A.; Tayber, O.; Brody, T.; Shu, P.; Hawkins, F.; Kennedy, B.; Baldini, L.; Ebeling, C.; Alperin, G. D.; Deeds, J.; Lakey, N. D.; Culpepper, J.; Chen, H.; Glucksman-Kuis, M. A.; Moore, K. J. und . (1996): Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family, *Cell* 85 [2], Seite 281-290.

Koolhaas, J. M.; De Boer, S. F.; De Rutter, A. J.; Meerlo, P. und Sgoifo, A. (1997): Social stress in rats and mice, *Acta Physiol Scand. Suppl* 640, Seite 69-72.

Kordik, C. P. und Reitz, A. B. (1999): Pharmacological treatment of obesity: therapeutic strategies, *J Med Chem.* 42 [2], Seite 181-201.

Kral, J. G. (2001): Morbidity of severe obesity, *Surg. Clin North Am* 81 [5], Seite 1039-1061.

Künast, Renate (2004): Plattform "Ernährung und Bewegung" - Gemeinsame Erklärung zwischen Bundesverbraucherministerium und der Lebensmittel-wirtschaft über die Errichtung einer gesamtgesellschaftlichen Plattform zur Förderung von Maßnahmen der Ernährungsaufklärung und der Steigerung der körperlichen Aktivität bei Kindern und Jugendlichen zur Prävention von Übergewicht., Pressemitteilung Nr.38 vom 11.Februar 2004. URL: <http://www.verbraucherministerium.de/index-000C07D0943F102B8D2A6521C0A8D816.html>

Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Vigo-Pelfrey, C.; Kasunic, T. C.; Kirkpatrick, J. B.; Murdoch, G. H.; Ball, M. J. und Roher, A. E. (1996): Water-soluble A β (N-40, N-

42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains, *Journal of Biological Chemistry* 271 [8], Seite 4077-4081.

Leibowitz, Sarah F. und Wortley, Katherine E. (2004): Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions*1, *Peptides* 25 [3], Seite 473-504.

Leissring, M. A.; Farris, W.; Chang, A. Y.; Walsh, D. M.; Wu, X.; Sun, X.; Frosch, M. P. und Selkoe, D. J. (2003): Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death, *Neuron* 40 [6], Seite 1087-1093.

Letarte, M.; Vera, S.; Tran, R.; Addis, J. B.; Onizuka, R. J.; Quackenbush, E. J.; Jongeneel, C. V. und McInnes, R. R. (1988): Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase, *J Exp Med* 168 [4], Seite 1247-1253.

Li, W.; Moore, M. J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S. K.; Berne, M. A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T. C.; Choe, H. und Farzan, M. (2003): Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature* 426 [6965], Seite 450-454.

Liu, S. T.; Howlett, G. und Barrow, C. J. (1999): Histidine-13 is a crucial residue in the zinc ion-induced aggregation of the A beta peptide of Alzheimer's disease, *Biochemistry* 38 [29], Seite 9373-9378.

Lu, B.; Gerard, N. P.; Kolakowski, L. F., Jr.; Bozza, M.; Zurakowski, D.; Finco, O.; Carroll, M. C. und Gerard, C. (1995): Neutral endopeptidase modulation of septic shock, *J Exp Med* 181 [6], Seite 2271-2275.

Lue, L. F.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L.; Beach, T.; Kurth, J. H.; Rydel, R. E. und Rogers, J. (1999): Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease, *Am.J.Pathol.* 155 [3], Seite 853-862.

Malfroy, B.; Kuang, W. J.; Seeburg, P. H.; Mason, A. J. und Schofield, P. R. (1988): Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase), *FEBS Lett* 229 [1], Seite 206-210.

Malfroy, B.; Schofield, P. R.; Kuang, W. J.; Seeburg, P. H.; Mason, A. J. und Henzel, W. J. (1987): Molecular cloning and amino acid sequence of rat enkephalinase, *Biochem Biophys.Res Commun.* 144 [1], Seite 59-66.

Malfroy, B.; Swerts, J. P.; Guyon, A.; Roques, B. P. und Schwartz, J. C. (1978): High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine, *Nature* 276 [5687], Seite 523-526.

Mann, D. M. (1988): The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease, *Mech.Ageing Dev.* 43 [2], Seite 99-136.

Marcic, B.; Deddish, P. A.; Jackman, H. L. und Erdos, E. G. (1999): Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor, *Hypertension* 33 [3], Seite 835-843.

Marr, R. A.; Guan, H.; Rockenstein, E.; Kindy, M.; Gage, F. H.; Verma, I.; Masliah, E. und Hersh, L. B. (2004): Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels, *J Mol.Neurosci.* 22 [1-2], Seite 5-11.

Marr, Robert A.; Rockenstein, Edward; Mukherjee, Atish; Kindy, Mark S.; Hersh, Louis B.; Gage, Fred H.; Verma, Inder M. und Masliah, Eliezer (2003): Neprilysin Gene Transfer Reduces Human Amyloid Pathology in Transgenic Mice, *Journal of Neuroscience* 23 [6], Seite 1992-1996.

- Matsas, R.; Kenny, A. J. und Turner, A. J. (1984): The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase-24.11, *Biochem J* 223 [2], Seite 433-440.
- Maul, B.; Siems, W. E.; Hoehe, M. R.; Grecksch, G.; Bader, M. und Walther, T. (2001): Alcohol consumption is controlled by angiotensin II, *FASEB J.* 15 [9], Seite 1640-1642.
- McDonald, J. K. (1986): *Exopeptidases, Mammalian Proteases*, Academic Press, London.
- McLean, C. A.; Cherny, R. A.; Fraser, F. W.; Fuller, S. J.; Smith, M. J.; Beyreuther, K.; Bush, A. I. und Masters, C. L. (1999): Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Ann.Neurol.* 46 [6], Seite 860-866.
- Melzig, M. F. und Escher, F (2002): Induction of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme activity of SK-N-SH cells in vitro by quercetin and resveratrol., *Pharmazie* 57 [8], Seite 556-558.
- Melzig, M. F. und Janka, M (2003): Enhancement of neutral endopeptidase activity in SK-N-SH cells by green tea extract., *Phytomedicine* 10 [6-7], Seite 494-498.
- Melzig, M. F.; Papsdorf, G.; Putscher, I.; Winkler, A. und Siems, W. E. (1998): Inhibition of corticotropin releasing factor (CRF)-induced adrenocorticotropin (ACTH) secretion in pituitary corticotropic cells by substance P, *Pharmazie* 53 [8], Seite 569-572.
- Menke, K. H. und Huss, W. (1980): *Tierernährung und Futtermittelkunde.*, 2. Auflage. Auflage .
- Messing, R. O. und Diamond, I (2001): Alcoholism, *Encyclopedia of Life Sciences*. URL: <http://els.wiley.com>
- Miller, Bonnie C.; Eckman, Elizabeth A.; Sambamurti, Kumar; Dobbs, Nicole; Chow, K. Martin; Eckman, Christopher B.; Hersh, Louis B. und Thiele, Dwain L. (2003): Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 [10], Seite 6221-6226.
- Mohajeri, M. H.; Wollmer, M. A. und Nitsch, R. M. (2002): Abeta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo, *J Biol Chem.* 277 [38], Seite 35460-35465.
- Mokdad, A. H.; Bowman, B. A.; Ford, E. S.; Vinicor, F.; Marks, J. S. und Koplan, J. P. (2001): The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States, *JAMA* 286 [10], Seite 1195-1200.
- Moller, C.; Sommer, W.; Thorsell, A.; Rimondini, R. und Heilig, M. (2002): Anxiogenic-like action of centrally administered glucagon-like peptide-1 in a punished drinking test, *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol Psychiatry* 26 [1], Seite 119-122.
- Morgan, D.; Grant, K. A.; Gage, H. D.; Mach, R. H.; Kaplan, J. R.; Prioleau, O.; Nader, S. H.; Buchheimer, N.; Ehrenkaufer, R. L. und Nader, M. A. (2002): Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration, *Nat Neurosci* 5 [2], Seite 169-174.
- Mukherjee, A.; Song, E.; Kihiko-Ehmann, M.; Goodman, J. P., Jr.; Pyrek, J. S.; Estus, S. und Hersh, L. B. (2000): Insulysin hydrolyzes amyloid beta peptides to products that are neither neurotoxic nor deposit on amyloid plaques, *J Neurosci.* 20 [23], Seite 8745-8749.

- Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K. und Schäfer-Korting, M. (2001): Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie., 8. Auflage , Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Naggert, J. K.; Fricker, L. D.; Varlamov, O.; Nishina, P. M.; Rouille, Y.; Steiner, D. F.; Carroll, R. J.; Paigen, B. J. und Leiter, E. H. (1995): Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity, *Nat Genet.* 10 [2], Seite 135-142.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) (1992): The genetics of alcoholism, *Alcohol Alert* 18. URL: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa18.htm>
- Nestler, E. J. (2001): Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction, *Nat Rev. Neurosci.* 2 [2], Seite 119-128.
- North, M. A. (1999): Advances in the molecular genetics of obesity., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 [3], Seite 283-288.
- O'Callaghan, J.; Croft, P. und Little, H. J. (2002): Effects of intraperitoneal injections of saline on the alcohol and sucrose consumption of C57/BL10 mice, *Psychopharmacology (Berl)* 160, Seite 206-212.
- Oefner, C.; D'Arcy, A.; Hennig, M.; Winkler, F. K. und Dale, G. E. (2000): Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon, *J Mol. Biol.* 296 [2], Seite 341-349.
- Olive, M. F.; Mehmert, K. K.; Koenig, H. N.; Camarini, R.; Kim, J. A.; Nannini, M. A.; Ou, C. J. und Hodge, C. W. (2003): A role for corticotropin releasing factor (CRF) in ethanol consumption, sensitivity, and reward as revealed by CRF-deficient mice, *Psychopharmacology (Berl)* 165 [2], Seite 181-187.
- Olivecrona, T.; Chernick, S. S.; Bengtsson-Olivecrona, G.; Paterniti, J. R., Jr.; Brown, W. V. und Scow, R. O. (1985): Combined lipase deficiency (cld/cld) in mice. Demonstration that an inactive form of lipoprotein lipase is synthesized, *J Biol Chem.* 260 [4], Seite 2552-2557.
- Oliveri, Carla; Ocaranza, Maria Paz; Campos, Ximena; Lavandero, Sergio und Jalil, Jorge E. (2001): Angiotensin I-Converting Enzyme Modulates Neutral Endopeptidase Activity in the Rat, *Hypertension* 38 [3], Seite 650-654.
- Opazo, C.; Huang, X.; Cherny, R. A.; Moir, R. D.; Roher, A. E.; White, A. R.; Cappai, R.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E.; Inestrosa, N. C. und Bush, A. I. (2002): Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂, *J Biol Chem.* 277 [43], Seite 40302-40308.
- Ortlepp, J. R.; Breuer, J.; Eitner, F.; Kluge, K.; Kluge, R.; Floege, J.; Hollweg, G.; Hanrath, P. und Joost, H. G. (2002): Inhibition of the renin-angiotensin system ameliorates genetically determined hyperinsulinemia, *Eur. J Pharmacol.* 436 [1-2], Seite 145-150.
- Otvos, L., Jr.; Szendrei, G. I.; Lee, V. M. und Mantsch, H. H. (1993): Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents, *Eur. J Biochem* 211 [1-2], Seite 249-257.
- Padovani, A.; Pastorino, L.; Borroni, B.; Colciaghi, F.; Rozzini, L.; Monastero, R.; Perez, J.; Pettenati, C.; Mussi, M.; Parrinello, G.; Cottini, E.; Lenzi, G. L.; Trabucchi, M.; Cattabeni, F. und Di Luca, M. (2001): Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD, *Neurology* 57 [12], Seite 2243-2248.

- Panchenko, L. F.; Brusov, O. S. und Beliaev, N. A. (1984): [Mechanism of action of ethanol on enkephalinase A activity in the rat brain], *Biull.Eksp.Biol Med.* 97 [6], Seite 691-692.
- Papandreou, C. N.; Usmani, B.; Geng, Y.; Bogenrieder, T.; Freeman, R.; Wilk, S.; Finstad, C. L.; Reuter, V. E.; Powell, C. T.; Scheinberg, D.; Magill, C.; Scher, H. I.; Albino, A. P. und Nanus, D. M. (1998): Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression, *Nat Med.* 4 [1], Seite 50-57.
- Perry, T. A. und Greig, N. H. (2004): A new Alzheimer's disease interventive strategy: GLP-1, *Curr.Drug Targets.* 5 [6], Seite 565-571.
- Perutz, M. F.; Finch, J. T.; Berriman, J. und Lesk, A. (2002): Amyloid fibers are water-filled nanotubes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 [8], Seite 5591-5595.
- Phillips, M. S.; Liu, Q.; Hammond, H. A.; Dugan, V.; Hey, P. J.; Caskey, C. J. und Hess, J. F. (1996): Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat.Genet.* 13 [1], Seite 18-19.
- Pitschke, M.; Prior, R.; Haupt, M. und Riesner, D. (1998): Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy, *Nat Med.* 4 [7], Seite 832-834.
- Popov, N.; Pohle, W.; Lossner, B.; Schulzeck, S.; Schmidt, S.; Ott, T. und Matthies, H. (1973): Regional distribution of RNA and protein radioactivity in the rat brain after intraventricular application of labeled precursors, *Acta Biol Med.Ger* 31 [1], Seite 51-62.
- Quay, T.; Slaughter, C.; Davis, T. P.; Merrill, B. J. und Hersh, L. B. (1994): Positional effects in the neprilysin (neutral endopeptidase) reaction, *Arch.Biochem Biophys.* 308 [1], Seite 133-136.
- Rawlings, N. D. und Barrett, A. J. (1993): Evolutionary families of peptidases, *Biochem J* 290 (Pt 1), Seite 205-218.
- Redei, E.; Branch, B. J.; Gholami, S.; Lin, E. Y. und Taylor, A. N. (1988): Effects of ethanol on CRF release in vitro, *Endocrinology* 123 [6], Seite 2736-2743.
- Richter, R. M.; Zorrilla, E. P.; Basso, A. M.; Koob, G. F. und Weiss, F. (2000): Altered amygdalar CRF release and increased anxiety-like behavior in Sardinian alcohol-preferring rats: a microdialysis and behavioral study, *Alcohol Clin Exp Res* 24 [12], Seite 1765-1772.
- Ritchie, J. C.; Davis, T. P. und Nemeroff, C. B. (2003): Action of three ectopeptidases on corticotropin-releasing factor: metabolism and functional aspects, *Neuropsychopharmacology* 28 [1], Seite 22-33.
- Rivier, C.; Bruhn, T. und Vale, W. (1984): Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF), *J Pharmacol Exp Ther.* 229 [1], Seite 127-131.
- Riviere, P. J. und Bueno, L. (1987): Origin of the stimulation of food intake by oral administration of enkephalinase inhibitors in sheep, *Life Sci.* 41 [3], Seite 333-339.
- Roach, M. K. und Creaven, P. J. (1968): A micro-method for the determination of acetaldehyde and ethanol in blood, *Clin Chim.Acta* 21 [2], Seite 275-278.
- Robertson, J. M.; Harding, S. und Grupp, L. A. (1994): The reduction in alcohol intake produced by enalapril is not attenuated by centrally administered angiotensin inhibitors, *Alcohol* 11 [4], Seite 295-299.

Roher, Alex E.; Chaney, Michael O.; Kuo, Yu Min; Webster, Scott D.; Stine, W. Blaine; Haverkamp, Lanny J.; Woods, Amina S.; Cotter, Robert J.; Tuohy, James M.; Krafft, Grant A.; Bonnell, Barry S. und Emmerling, Mark R. (1996): Morphology and Toxicity of Abeta -(1-42) Dimer Derived from Neuritic and Vascular Amyloid Deposits of Alzheimer's Disease, *Journal of Biological Chemistry* 271 [34], Seite 20631-20635.

Roques, B. P.; Fournie-Zaluski, M. C.; Soroca, E.; Lecomte, J. M.; Malfroy, B.; Llorens, C. und Schwartz, J. C. (1980): The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice, *Nature* 288 [5788], Seite 286-288.

Roques, B. P.; Noble, F.; Dauge, V.; Fournie-Zaluski, M. C. und Beaumont, A. (1993): Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology, *Pharmacol.Rev.* 45 [1], Seite 87-146.

Rottkamp, C. A.; Atwood, C. S.; Joseph, J. A.; Nunomura, A.; Perry, G. und Smith, M. A. (2002): The state versus amyloid-beta: the trial of the most wanted criminal in Alzheimer disease, *Peptides* 23 [7], Seite 1333-1341.

Rouleau, J. L.; Pfeffer, M. A.; Stewart, D. J.; Isaac, D.; Sestier, F.; Kerut, E. K.; Porter, C. B.; Proulx, G.; Qian, C. und Block, A. J. (2000): Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial, *Lancet* 356 [9230], Seite 615-620.

Sahli, S.; Stump, B.; Welti, T.; Blum-Kaelin, D.; Aebi, J. D.; Oefner, C.; Bohm, H. J. und Diederich, F. (2004): Structure-based design, synthesis, and in vitro evaluation of nonpeptidic neprilysin inhibitors, *Chembiochem.* 5 [7], Seite 996-1000.

Saido, T. C. (2004): Aβ (1-40) and (1-42) levels in plasma of NEP-KO and wildtype mice., Persönliche Mitteilung (Email).

Saito, Takashi; Iwata, Nobuhisa; Tsubuki, Satoshi; Takaki, Yoshie; Takano, Jiro; Huang, Shu Ming; Suemoto, Takahiro; Higuchi, Makoto und Saido, Takaomi C. (2005): Somatostatin regulates brain amyloid [beta] peptide A[beta]42 through modulation of proteolytic degradation, *Nat Med* 11 [4], Seite 434-439.

Sakai, A.; Ujike, H.; Nakata, K.; Takehisa, Y.; Imamura, T.; Uchida, N.; Kanzaki, A.; Yamamoto, M.; Fujisawa, Y.; Okumura, K. und Kuroda, S. (2004): Association of the Neprilysin gene with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease, *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* 17 [3], Seite 164-169. URL: PM:14739539

Sarnyai, Z.; Shaham, Y. und Heinrichs, S. C. (2001): The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction, *Pharmacol.Rev.* 53 [2], Seite 209-243.

Schling, P. und Schäfer, T. (2002): Human adipose tissue cells keep tight control on the angiotensin II levels in their vicinity, *J Biol Chem.* 277 [50], Seite 48066-48075.

Schneider, R (1996): Relevanz und Kosten der Adipositas in Deutschland, *Ernährungs-Umschau* 43, Seite 369-374.

Schoeller, Olivia (2004): Der schlankere Amerikaner, *Berliner Zeitung*, Seite 1-1.

Seidah, N. G.; Benjannet, S.; Hamelin, J.; Mamarbachi, A. M.; Basak, A.; Marcinkiewicz, J.; Mbikay, M.; Chretien, M. und Marcinkiewicz, M. (1999): The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 885, Seite 57-74.

Selkoe, D. J. (2002a): Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease, *J Clin Invest* 110 [10], Seite 1375-1381.

Selkoe, D. J. (2003a): Folding proteins in fatal ways, *Nature* 426 [6968], Seite 900-904.

Selkoe, D. J. und Podlisny, M. B. (2002b): Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease, *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 3, Seite 67-99.

Selkoe, D. J. und Schenk, D. (2003b): Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43, Seite 545-584.

Sharma, Arya M. (2004): Is There a Rationale for Angiotensin Blockade in the Management of Obesity Hypertension?, *Hypertension* 44 [1], Seite 12-19.

Shipp, M. A.; Stefano, G. B.; Switzer, S. N.; Griffin, J. D. und Reinherz, E. L. (1991): CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide-induced changes in neutrophil morphology, migration, and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation, *Blood* 78 [7], Seite 1834-1841.

Shirotani, K.; Tsubuki, S.; Iwata, N.; Takaki, Y.; Harigaya, W.; Maruyama, K.; Kiryu-Seo, S.; Kiyama, H.; Iwata, H.; Tomita, T.; Iwatsubo, T. und Saido, T. C. (2001): Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases, *J Biol Chem.* 276 [24], Seite 21895-21901.

Shoghi-Jadid, K.; Small, G. W.; Agdeppa, E. D.; Kepe, V.; Ercoli, L. M.; Siddarth, P.; Read, S.; Satyamurthy, N.; Petric, A.; Huang, S. C. und Barrio, J. R. (2002): Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease, *Am.J Geriatr.Psychiatry* 10 [1], Seite 24-35.

Siems, W.; Maul, B.; Krause, W.; Gerard, C.; Hauser, K. F.; Hersh, L. B.; Fischer, H. S.; Zernig, G. und Saria, A. (2000): Neutral endopeptidase and alcohol consumption, experiments in neutral endopeptidase-deficient mice, *Eur.J.Pharmacol.* 397 [2-3], Seite 327-334.

Siems, Wolf-Eberhard; Maul, Björn; Wiesner, Burkard; Becker, Matthias; Walther, Thomas; Rothe, L. und Winkler, Anett (2003): Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes, *Andrologia* 35 [1], Seite 44-54.

Sillaber, I.; Rammes, G.; Zimmermann, S.; Mahal, B.; Zieglgansberger, W.; Wurst, W.; Holsboer, F. und Spanagel, R. (2002): Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors, *Science* 296 [5569], Seite 931-933.

Slawecki, C. J.; Jimenez-Vasquez, P.; Mathe, A. A. und Ehlers, C. L. (2001): Substance P and neurokinin levels are decreased in the cortex and hypothalamus of alcohol-preferring (P) rats, *J.Stud.Alcohol* 62 [6], Seite 736-740.

Soleilhac, J. M.; Lafuma, C.; Porcher, J. M.; Auburtin, G. und Roques, B. P. (1996): Characterization of a soluble form of neutral endopeptidase-24.11 (EC 3.4.24.11) in human serum: enhancement of its activity in serum of underground miners exposed to coal dust particles, *Eur.J.Clin.Invest* 26 [11], Seite 1011-1017.

Solomon, C. G. und Manson, J. E. (1997): Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data, *Am J Clin Nutr.* 66 [4 Suppl], Seite 1044S-1050S.

Steinmetz, A.; Fenselau, S. und Schrezenmeir, J. (2001): Treatment of dyslipoproteinemia in the metabolic syndrome, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 [4], Seite S548-S559.

Sturiale, S.; Barbara, G.; Qiu, B.; Figini, M.; Geppetti, P.; Gerard, N.; Gerard, C.; Grady, E. F.; Bunnett, N. W. und Collins, S. M. (1999): Neutral endopeptidase (EC

3.4.24.11) terminates colitis by degrading substance P, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 [20], Seite 11653-11658.

Szczepanska, R. und Grupp, L. A. (1993): Bestatin, an aminopeptidase B inhibitor, selectively reduces alcohol intake in rats, Alcohol Clin Exp Res 17 [2], Seite 434-437.

Szczepanska, R.; Harding, S. und Grupp, L. A. (1996): Effect of bestatin, an aminopeptidase inhibitor, on alcohol intake in alcohol-preferring P rats, Alcohol Clin Exp Res 20 [3], Seite 561-565.

Takaki, Y.; Iwata, N.; Tsubuki, S.; Taniguchi, S.; Toyoshima, S.; Lu, B.; Gerard, N. P.; Gerard, C.; Lee, H. J.; Shirotani, K. und Saido, T. C. (2000): Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain, Journal of Biochemistry 128 [6], Seite 897-902.

Tam, L. T.; Engelbrecht, S.; Talent, J. M.; Gracy, R. W. und Erdos, E. G. (1985): The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage, Biochem Biophys. Res Commun. 133 [3], Seite 1187-1192.

The Protein Data Bank (2004): 1DMT, <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=94401132867010&pdbId=1DMT>.

Thiele, Todd E.; Navarro, Montserrat; Sparta, Dennis R.; Fee, Jon R.; Knapp, Darin J. und Cubero, Inmaculada (2003): Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways?, Neuropeptides 37 [6], Seite 321-337.

Timpl, P.; Spanagel, R.; Sillaber, I.; Kresse, A.; Reul, J. M.; Stalla, G. K.; Blanquet, V.; Steckler, T.; Holsboer, F. und Wurst, W. (1998): Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1, Nat Genet. 19 [2], Seite 162-166.

Toyoda, M.; Nakamura, M.; Makino, T.; Kagoura, M. und Morohashi, M. (2002): Sebaceous glands in acne patients express high levels of neutral endopeptidase, Exp Dermatol. 11 [3], Seite 241-247.

Tsubuki, S.; Takaki, Y. und Saido, T. C. (2003): Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic degradation, Lancet 361 [9373], Seite 1957-1958.

Turner, A. J. (1998): Neprilysin, Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. und Woessner, J. F., Handbook of proteolytic enzymes, Seite 1080-1085, Academic Press, San Diego.

Turner, A. J. (2003): Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries, Biochem Soc Trans 31 [Pt 3], Seite 723-727.

Vassar, R. und Citron, M. (2000): Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research, Neuron 27 [3], Seite 419-422.

Vaughan, D. W. und Peters, A. (1981): The structure of neuritic plaque in the cerebral cortex of aged rats, J Neuropathol. Exp Neurol. 40 [4], Seite 472-487.

Vekrellis, Konstantinos; Ye, Zhen; Qiu, Wei Qiao; Walsh, Dominic; Hartley, Dean; Chesneau, Valerie; Rosner, Marsha Rich und Selkoe, Dennis J. (2000): Neurons Regulate Extracellular Levels of Amyloid beta -Protein via Proteolysis by Insulin-Degrading Enzyme, Journal of Neuroscience 20 [5], Seite 1657-1665.

Waksman, G.; Hamel, E.; Fournie-Zaluski, M. C. und Roques, B. P. (1986): Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 83 [5], Seite 1523-1527.

- Wallenius, Ville; Wallenius, Kristina; Åhrén, Bo; Rudling, Mats; Carlsten, Hans; Dickson, Suzanne L.; Ohlsson, Claes und Jansson, John-Olov (2005): Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity, *Nature Medicine* 8, Seite 75-79.
- Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J. und Selkoe, D. J. (2002): Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, *Nature* 416 [6880], Seite 535-539.
- Walther, T.; Albrecht, D.; Becker, A.; Becker, M.; Schubert, M.; Maul, B.; Stoltenburg, G.; Schultheiss, H. P.; Grecksch, G. und Siems, W. E. (2005): Janus-head neutral endopeptidase (NEP) - Improved learning and memory in old-aged mice that are deficient in the amyloid- β -degrading peptidase NEP., In Vorbereitung.
- Walther, T.; Stepan, H.; Pankow, K.; Becker, M.; Schultheiss, H. P. und Siems, W. E. (2004): Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide, *Biol.Chem.* 385 [2], Seite 179-184.
- Wengenack, T. M.; Curran, G. L. und Poduslo, J. F. (2000): Targeting alzheimer amyloid plaques in vivo, *Nat Biotechnol.* 18 [8], Seite 868-872.
- Wick, M. J.; Mihic, S. J.; Ueno, S.; Mascia, M. P.; Trudell, J. R.; Brozowski, S. J.; Ye, Q.; Harrison, N. L. und Harris, R. A. (1998): Mutations of gamma-aminobutyric acid and glycine receptors change alcohol cutoff: evidence for an alcohol receptor?, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 [11], Seite 6504-6509.
- Winkler, Anett; Rottmann, Matthias; Heder, Gottfried; Hyytiä, Petri; Siems, Wolf-Eberhard und Melzig, Matthias F. (1998): Gene expression and activity of specific opioid-degrading enzymes in different brain regions of the AA and ANA lines of rats, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1406 [3], Seite 219-227.
- Wong-Leung, Y. L. und Kenny, A. J. (1968): Some properties of a microsomal peptidase in rat kidney, *Biochem J* 110 [2], Seite 5P.
- Yamaguchi, T.; Fukase, M.; Arao, M.; Sugimoto, T. und Chihara, K. (1992): Endothelin 1 hydrolysis by rat kidney membranes, *FEBS Lett.* 309 [3], Seite 303-306.
- Yang, D. S.; McLaurin, J.; Qin, K.; Westaway, D. und Fraser, P. E. (2000): Examining the zinc binding site of the amyloid-beta peptide, *Eur.J Biochem* 267 [22], Seite 6692-6698.
- Yasojima, K.; Akiyama, H.; McGeer, E. G. und McGeer, P. L. (2001a): Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide, *Neurosci.Lett.* 297 [2], Seite 97-100.
- Yasojima, K.; McGeer, E. G. und McGeer, P. L. (2001b): Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain, *Brain Res* 919 [1], Seite 115-121.
- Yu, G.; Nishimura, M.; Arawaka, S.; Levitan, D.; Zhang, L.; Tandon, A.; Song, Y. Q.; Rogaeva, E.; Chen, F.; Kawarai, T.; Supala, A.; Levesque, L.; Yu, H.; Yang, D. S.; Holmes, E.; Milman, P.; Liang, Y.; Zhang, D. M.; Xu, D. H.; Sato, C.; Rogaev, E.; Smith, M.; Janus, C.; Zhang, Y.; Aebersold, R.; Farrer, L. S.; Sorbi, S.; Bruni, A.; Fraser, P. und George-Hyslop, P. (2000): Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing, *Nature* 407 [6800], Seite 48-54.

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L. und Friedman, J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, Nature 372 [6505], Seite 425-432.

Zhu, X.; Zhou, A.; Dey, A.; Norrbom, C.; Carroll, R.; Zhang, C.; Laurent, V.; Lindberg, I.; Ugleholdt, R.; Holst, J. J. und Steiner, D. F. (2002): Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99 [16], Seite 10293-10298.

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis (Auswahl)

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym, <i>angiotensin-converting enzyme</i>
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid (= Atrialer Natriuretischer Faktor, ANF)
APN	Aminopeptidase N
AS	Aminosäure(n)
BMI	Body-Mass-Index, <i>body mass index</i>
CPE	Carboxypeptidase E
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon (= Corticotropin-Releasing Faktor, CRF)
DPP IV	Dipeptidyl-Peptidase IV
ECE	Endothelin-Konversionsenzym, <i>endothelin-converting enzyme</i>
ESI	Elektron-Spray-Ionisation, <i>electron spray ionisation</i>
GLP-1	Glucagon-like Peptid-1
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante im Michaelis-Menten-Modell
K_{m}	Michaelis-Menten-Konstante
LTP	<i>long-term potentiation</i>
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation, <i>matrix-assisted laser desorption/ionisation – time-of-flight</i>
MeCN	Methylcyanid, Acetonitril
MS	Massenspektrometrie
NEP	Neutrale Endopeptidase, <i>neutral endopeptidase</i> , Neprilysin
RP-HPLC	<i>reversed-phase</i> -HPLC
TFA	Trifluoressigsäure, <i>trifluoro acetic acid</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZNS	Zentral-Nervensystem

Bei Enzymen, Peptiden u. ä., die in der Literatur zumeist nur mit englischem Namen bekannt sind, wurde die deutsche Benennung an der Vorgehensweise im Pharmakologie-Lehrbuch „Arzneimittelwirkungen“ [Mutschler, 01] orientiert. Englische Bezeichnungen werden i. d. R. kursiv gedruckt. Statt des physikalisch richtigen Ausdrucks „Körpermasse“ wird der gängigere Ausdruck „Körpergewicht“ benutzt – im Gegensatz zu „Muskelmasse“, „Fettmasse“ usw.. Die Bezeichnung „Ratio“ (meist in Zusammensetzung als „Präferenzratio“ oder „Alkoholpräferenzratio“) wird hier in der Bedeutung „Quotient“ oder „Verhältnis“ gebraucht. Sie beschreibt den Anteil der konsumierten Alkohollösung (oder einer anderen Trinklösung) an der Gesamttrinkmenge, als Bruchteil von 1.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Matthias F. Melzig bedanken, ebenso wie für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen und die vielen Freiheiten, die er mir einräumte.

Prof. Dr. Thomas Walther danke ich für die vielen Anregungen und Diskussionen, die oft neue Blickwinkel auf meine Arbeit eröffneten sowie für seine große Unterstützung bei der Kontaktaufnahme zu neuen Kooperationspartnern.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biochemische Neurobiologie am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin (FMP) möchte ich besonders für ihre Kollegialität, für die netten Kaffeerunden sowie für die großen und kleinen Hilfen im Laboralltag danken. Ich bedanke mich besonders bei Kerstin Krüger für die Unterstützung bei den enzymatischen Hydrolysestudien.

Ebenso möchte ich mich herzlich bedanken bei den vielen Mitarbeitern des FMP und anderer Einrichtungen, die mich bei meinen Arbeiten unterstützt haben, allen voran Heidi Lerch und Dr. Michael Schümann (Massenspektrometrie), Martina Ringling (Elektronenmikroskopie), Dr. Regina Richter (Mikrodialyse), Dr. Reinhart Kluge (NMR-Analyse der Körperzusammensetzung) sowie bei allen Tierpflegerinnen. Herrn Ingo Baeger bin ich für die Hilfe bei den komplexen statistischen Berechnungen und die vielen abendlichen Diskussionen darüber außerordentlich dankbar.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Wolf-Eberhard Siems, der nicht nur ein hervorragender wissenschaftlicher Betreuer war, sondern mit vielen Ideen, großer Kreativität und breitem Fach- und Allgemeinwissen zum Gelingen meiner Arbeit wesentlich beigetragen hat. Auch für die intensive Einarbeitung und die praktische Unterstützung in der Enzymanalytik und bei den Tierpräparationen sowie für die Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Vielen Dank auch an Dr. Winfried Krause der meine Arbeit Korrektur gelesen und mir oft mit seinem großen Fachwissen geholfen hat.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mich das gesamte Studium hindurch gefördert und mit großem Interesse begleitet haben. Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Franziska sagen, wie dankbar ich für ihre Geduld und ihr Verständnis beim Schreiben der Dissertation und für die Aufmunterung während der Durststrecken dieser Arbeit bin.

Publikationen

Artikel

Becker M., Gembardt F., Maul B., Walther T., Siems W.-E.: Neprilysin-deficient mice reveal increased and enhanced alcohol consumption under conditions exerting social defeat stress. (in Vorbereitung)

Becker M., Metges C. C., Kluge R., Walther T., Siems W.-E.: Mice deficient in the neprilysin gene develop an obese phenotype. (in Vorbereitung)

Walther T., Stepan H., Pankow K., Becker M., Schultheiss H.-P., Siems W.-E.: Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide. Biol. Chem., Vol. 385, pp. 179-184, February 2004

Maul B., Krause W., Pankow K., Becker M., Gembardt F., Alenina N., Walther T., Bader M., Siems W.-E.: Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. FASEB J. 2005 Sep;19(11):1474-81.

Walther T., Albrecht D., Becker A., Becker M., Schubert M., Maul B., Schultheiss H.-P., Grecksch G., Siems W.-E.: Janus head neutral endopeptidase (NEP) - improved learning and memory in old-aged mice that are deficient in the amyloid β -degrading peptidase NEP. (in Vorbereitung)

Siems W.-E., Maul B., Wiesner B., Becker M., Walther T., Rothe L., Winkler A.: Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. Andrologia. 2003 Feb;35(1):44-54.

Poster / Vorträge

- Mainz / 45. Frühjahrstagung der DGPT 2004

Becker M., Kluge R., Metges C. C., Gembardt F., Siems W.-E., Walther T. (Berlin/ Potsdam/ Dummerstorf/ Rotterdam): NEP-deficient mice develop a late-onset obese phenotype: A model for human polyfactorial adipositas.

Sun X., Pankow K., Becker M., Papsdorf G., Krause W., Danilov S., Siems W.E., Maul B. (Berlin): Expression and enzymatic properties of domain selective murine ACE

Pankow K., Becker M., Krause G., Diehl A., Walther T., Siems W.-E. (Berlin/Rotterdam): Sequential differences in the natriuretic peptides influence their catabolism by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11).

Walther T., Albrecht D., Becker A., Beyermann M., Pankow K., Gembardt F., Becker M., Maul B., Grecksch G., Siems W.-E. (Berlin/Magdeburg/Rotterdam): Janus head neutral endopeptidase (NEP) - improved learning and memory in old-aged mice that are deficient in the amyloid β -degrading peptidase NEP. (*Vortrag*)

- Potsdam / 40. Wissenschaftlicher Kongress der DGE 2003

Siems W.-E., Becker M., Maul B., Walther T.: Neutrale Endopeptidase-defiziente Mäuse entwickeln eine alters- und futterabhängige Fettleibigkeit. (*Vortrag*)

- Mainz / 44. Frühjahrstagung der DGPT 2003

Becker M., Siems W.-E., Könnecke I., Maul B., Walther T. (Berlin): Obese phenotype in NEP knockout mice: Correlation with age and diet and possible molecular mechanism.

Pankow K., Becker M., Diehl A., Krause W., Maul B., Walther T., Siems W.-E. (Berlin): Importance of neutral endopeptidase (NEP) on the catabolism of natriuretic peptides – in-vitro experiments with NEP-deficient mice.

- Mainz / 43. Frühjahrstagung der DGPT 2002

Becker M., Maul B., Krause W., Walther T., Saria A., Siems W.-E.: Neutral endopeptidase (NEP) activity modifies voluntary alcohol consumption in mice.

- Berlin, Sept. 2001 / Tagung der Deutschen Ges. für Andrologie / Poster:

Müller C., Alexandre-Lafont E., Becker M., Siems W.-E., Schill W-B., Köhn F-M: The enzymatic degradation of angiotensin I (A I) in human semen.

Lebenslauf

geboren am 07.06.1974 in Ludwigslust
verheiratet seit dem 01.10.2003 mit Franziska Becker, geb. Timpe
Kinder: Leonard Alexander Becker, geb. 05.12.2004

Berufstätigkeiten

Fachreferent in der Abt. Qualitätssicherung, Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen	seit Feb. 2005
Doktorand am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, AG Biochemische Neurobiologie	Apr. 2001 – Nov. 2004
Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharm. Chemie an der HU Berlin (Prof. Dr. B. Göber)	Mai 1997 – Jul. 1999

Praktika

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, AG Biochemische Neurobiologie	Mai – Okt. 2000
Rialto-Apotheke Berlin	Okt. 1999 – Apr. 2000

Studium

Approbation als Apotheker	Feb. 2001
Pharmaziestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin	1994-1999
3. Staatsexamen	Jan. 2001
2. Staatsexamen	Sep. 1999
1. Staatsexamen	Sep. 1997

Zivildienst

Im Sonderkindergarten der Lebenshilfe e.V. für behinderte Kinder sowie in der unfallchirurgischen Abteilung des Johanniter- Krankenhauses Stendal	1993-1994
---	-----------

Schulbildung

Winckelmann-Gymnasium Stendal, Abitur	1990-1993
Comenius-Schule mit erweitertem Fremdsprachenunterricht	1983-1990
Einschulung in Stendal	1981

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.